

Untersuchung der  
Acetyl-Coenzym A: $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase  
in gereinigten lysosomalen Membranen

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Beatrice Bodammer

aus Braunschweig

Göttingen

2007

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1	Die Lysosomen und Biosynthese lysosomaler Enzyme .....	6
1.2	Lysosomale Speicherkrankheiten .....	7
1.2.1	Die Mucopolysaccharidosen.....	8
1.2.2	Das Sanfilippo-Syndrom .....	11
1.2.3	Die Acetyl-Coenzym A: $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase .....	12
1.3	Die lysosomale Membran.....	14
1.3.1	Defekte der integralen lysosomalen Membranproteine .....	15
1.4	Reinigung lysosomaler Membranproteine.....	15
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material.....</b>	<b>18</b>
3.1	Geräte und Zubehör .....	18
3.2	Chemikalien.....	18
3.3	Standardlösungen .....	19
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>20</b>
4.1	Präparation von Lysosomen aus humaner Placenta.....	20
4.1.1	Herstellung des Organellenkonzentrats .....	20
4.1.2	Fraktionierung des Organellenkonzentrats .....	21
4.2	Proteinase-Inhibitoren .....	22
4.3	Membranpräparation durch Ultrazentrifugation.....	22
4.4	Membranpräparation durch Immunoabsorption aus " dichtem Pool" .....	22
4.4.1	Anreicherung lysosomaler Membranproteine .....	23
4.5	Subzelluläre Fraktionierung humaner Fibroblasten.....	24
4.5.1	Zellkultur .....	24
4.5.2	Zellernte .....	25
4.5.3	Die postnukleäre Trennung subzellulärer Partikel im Percoll-Gradienten .....	25
4.5.4	Affinitätsreinigung lysosomaler Fibroblasten-Membranen .....	26
4.6	Markierung von lysosomalen Membranen mit $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA .....	26
4.6.1	Markierung von durch Ultrazentrifugation angereicherten Membranen .....	26
4.6.2	Markierung von durch Immunoabsorption angereicherten Membranen .....	27
4.7	Solubilisierung von lysosomalen Membranen.....	28
4.8	Enzymaktivitäts- und Proteinbestimmungen .....	28
4.8.1	Hydrolasen.....	28
4.8.2	Acetyl-Coenzym A: $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase.....	28
4.8.3	Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen .....	29
4.8.4	Proteinbestimmung.....	29
4.9	Anreicherung der Acetyl-Coenzym A: $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase.....	30
4.9.1	Säulenchromatographie .....	30
4.9.2	Anionenaustauschchromatographie .....	30
4.9.3	Gelfiltrationschromatographie.....	30

4.10	Inhibitorstudien .....	31
4.10.1	Diethylpyrocarbonat (DEPC) .....	31
4.10.2	N-Bromosuccinimid (NBS).....	32
4.10.3	Vorbehandlung mit Acetyl-CoA.....	32
4.10.4	Vorbehandlung mit Glucosamin.....	32
4.11	Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch Free-Flow-Elektrophorese .....	32
4.11.1	Das Octopus-Gerät .....	32
4.11.2	Testexperiment für die Free Flow isoelektrische Fokussierung .....	33
4.11.3	Kontinuierliche Free-Flow isoelektrische Fokussierung im linearen pH-Gradienten .....	34
4.11.4	Ermittlung des isoelektrischen Punktes der Acetyltransferase .....	34
4.12	Herstellung der Affinitätsperlen.....	36
4.13	Zweidimensionale Elektrophorese .....	36
4.13.1	Probenvorbereitung .....	37
4.13.2	Aufbau der Fokussierungskammer .....	38
4.13.3	Die Fokussierung.....	38
4.13.4	Equilibrierung.....	39
4.13.5	Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese.....	39
4.14	Färbung mit Silbernitrat .....	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
5.1	Charakterisierung von dichten Lysosomen aus humaner Placenta .....	42
5.1.1	Affinitätsreinigung lysosomaler Membranen aus dem "dichten Pool" .....	42
5.2	Markierung eines Acetyl-CoA bindenden Proteins in der lysosomalen Membran.....	43
5.2.1	Strategie.....	43
5.2.2	Die Markierung .....	43
5.2.3	Zeitabhängigkeitsversuche zur Markierung.....	45
5.2.4	Markierung des Proteins in Fibroblasten mit und ohne genetischem Defekt .....	47
5.3	Etablierung eines Assays zur weiteren Identifizierung des Proteins.....	48
5.4	Versuche zur Hemmung und Spezifität der Acetyltransferase .....	50
5.4.1	Ermittlung eines Inhibitors .....	50
5.4.2	Nachweis der Acetyltransferase in humanen Fibroblasten und Überprüfung der Hemmbarkeit durch DEPC.....	51
5.5	Anreicherung der Acetyl-CoA:α-Glucosaminid N-Acetyltransferase (AT).....	52
5.5.1	Enzymsolubilisierung für die Säulenchromatographie .....	52
5.5.2	Anionenaustauschchromatographie .....	52
5.6	Überprüfung der Spezifität der radioaktiven Markierung .....	55
5.7	Bestimmung des isoelektrischen Punktes der nativen Acetyltransferase.....	57
5.8	Zweidimensionale (2D-)Gelelektrophorese lysosomaler Membranproteine .....	59
5.8.1	Qualitätskontrolle und Reproduzierbarkeit der zweidimensionalen Trennung.....	59
5.8.2	Chemische Modifikation durch Behandlung mit Acetyl-CoA im pH-Bereich 5-6 in der zweidimensionalen Trennung.....	60
5.8.3	Zweidimensionale Auftrennung der Enzym-Fraktion .....	62

5.8.4 Chemische Modifikation der Enzym-Fraktion mit Acetyl-CoA mit DEPC .....	64
5.9 Versuche zur Hemmung des mit $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA markierten Proteins .....	68
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>69</b>
6.1 Die Markierung .....	71
6.1.1 Isoelektrische Fokussierung .....	71
6.1.2 Zeitabhängigkeit der Markierung .....	71
6.1.3 Nachweis radioaktiv markierter Polypeptide in lysosomalen Membranen aus normalen und Sanfilippo C-Fibroblasten.....	72
6.2 Etablierung eines Assays zur weiteren Identifizierung des Proteins .....	72
6.2.1 Inhibitorstudien.....	73
6.2.2 Anreicherung der Acetyl-Coenzym A: $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase .....	73
6.3 Überprüfung der Spezifität der radioaktiven Markierung .....	74
6.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der nativen Acetyltransferase .....	75
6.5 Zweidimensionale (2D-)Gelelektrophorese der angereicherten Enzym-Fraktion .....	76
6.6 Chemische Modifikationen .....	77
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>8 Literatur.....</b>	<b>80</b>



*Abkürzungsverzeichnis*

× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
2D	Zweidimensionale (Elektrophorese)
2D5	Monoklonaler Antikörper gegen h-LAMP-2
2D5-C1Z	Monoklonale Antikörper gegen h-LAMP-2 gekoppelt an Acrylharzperlen
AT	Acetyl-CoenzymA:α-Glucosamin N-Acetyltransferase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-Hexosaminidase	β-N-Acetyl-Hexosaminidase, EC 3.2.1.52
Bq	Becquerel
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of Differentiation
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat (Detergenz)
cpm	Counts per minute (Radioaktivität)
DEPC	Diethypyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
FKS	Fötales Kälberserum
GlcU	Glucuronsäure/Glucuronat
HS	Heparansulfat
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
ISSD	Infant Sialic acid Storage Disorder
kDa	1000 Dalton (Molekulargewicht)
K <sub>I</sub>	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor Komplexes
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
LAMP	Lysosomal Associated Membrane Protein
LIMP	Lysosomal Integrated Membrane Protein
MAK	Monoklonaler Antikörper
MPS	Mucopolysaccharidose
NANA	N-Acetyl-Neuraminsäure
NBS	N-Bromosuccinimid
P.N.Ü.	Post Nukleärer Überstand
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SFC	Sanfilippo Syndrom Typ C
TBS	Tris Buffered Saline (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl)
Temed	Tetraethylmethylenediamin
TX-100	Triton X-100 (Detergenz)
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
Vit.	Vitamin
w/v	Prozent Gewicht pro Volumen (Gramm pro ml)

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Lysosomen und Biosynthese lysosomaler Enzyme

Die intrazelluläre Verdauung wurde durch Beobachtung der Phagozytose von Partikeln bei Amöben sowie bei Abwehrzellen mehrzelliger Organismen bereits im 19. Jahrhundert von Ilja Iljitsch Mechnikoff und seinen Nachfolgern postuliert. Die Organellen dieses Verdauungssystems sind mit einer Membran umschlossen und wurden als Lysosomen (griechisch: lysierende Partikel) bezeichnet. Sie kommen in nahezu allen eukaryotischen Zellen vor. Die biochemische und morphologische Charakterisierung begann in der Mitte des 21. Jahrhunderts durch C. de Duve, A.B. Novikoff, Rouiller, R. Wattiaux, L.H. Rome und anderen.

C. de Duve und J. Berthet untersuchten 1951 (de Duve, 1969) die Lokalisation der Glucose-6-Phosphatase erstmals durch isotonischen, schonenden Aufschluß von Rattenleber und differentieller Zentrifugation. Sie beobachteten dabei als Marker für die mitochondriale, später als granulär bezeichnete Fraktion u.a. die saure, unspezifische Phosphatase-Aktivität. Um die Aktivität messen zu können, waren Verfahren wie Frier-Tau-Schritte, hypotones Medium und Zugabe von Detergenzien nötig, um die Lysosomen zu öffnen.

Lysosomen enthalten zahlreiche Verdauungsenzyme und sind für die "Abfallbeseitigung" innerhalb der Zelle zuständig. Abbauprodukte werden teilweise 'recycled' und dem Stoffwechsel erneut zur Verfügung gestellt, während unverdauliche Abbauprodukte zurückgehalten und bis zum Zelltod im Lysosom, dann Residualkörper genannt, verbleiben. Verglichen mit anderen Organellen variiert die Morphologie des Lysosoms dadurch sehr stark, der Inhalt ist oft heterogen und schwer vorhersagbar, abhängig von der Aufnahme der abzubauenen Produkte und von der Zeit, die seitdem vergangen ist.

Das lysosomale Kompartiment erhält seine Inhaltsstoffe auf verschiedenen Wegen. Membranständige und lösliche lysosomale Proteine werden aufgrund ihrer N-terminalen Signalsequenz am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und kotranslational in das Lumen des ER transloziert bzw. in die Membran inseriert.

Die Übertragung von Vorläufer-Oligosacchariden auf bestimmte Asparagin-Reste erfolgt ebenfalls kotranslational. Im Golgiapparat erfolgt eine umfangreiche Prozessierung dieser Kohlenhydrate, die bei bestimmten löslichen Proteinen zur Anheftung von Mannose-6-Phosphat-Resten führt. Über diese Reste binden die Proteine im Trans-Golgi-Netzwerk an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, werden in spezialisierte Vesikel verpackt und in ein endosomales Kompartiment transportiert, wo es durch Ansäuerung zur Entkopplung von Ligand und Rezeptor kommt. In mesenchymalen und zum Teil auch anderen Zellen ist dies der Hauptmechanismus der lysosomalen Zielsteuerung löslicher Enzyme.

Allerdings ist auch bei seiner Abwesenheit, wie im Falle der I-Zell-Krankheit, noch eine Rest-Transportaktivität zu beobachten. Alternative Transportwege wurden u.a. für die saure Phosphatase (Waheed *et al.*, 1988), das Prosaposin (Hiesberger *et al.*, 1998) und den lysosomalen Transport der Lymphozyten (Lemansky & Hasilik, 2000) beschrieben. Lysosomale Membranproteine werden ebenfalls Mannose-6-Phosphat unabhängig über Signale auf ihrer cytoplasmatischen Domäne sortiert. Die neusynthetisierten lysosomalen Enzyme treffen in späten Endosomen auf die abzubauenen Substrate, lösliche sowie membranständige Makromoleküle, welche durch Endozytose und über frühe Lysosomen aufgenommen worden sind (Stoorvogel *et al.*, 1991). Schon in diesem Kompartiment finden proteolytische Prozesse statt. Von hier werden die lysosomalen Enzyme und ihre Substrate in Lysosomen überführt, wo der Abbau vollendet wird.

## **1.2 Lysosomale Speicherkrankheiten**

Erbliche lysosomale Speicherkrankheiten haben gemeinsam, daß sich in den Lysosomen bestimmter Zelltypen eine große Menge eines charakteristischen Spektrums von Molekülen anhäuft. Das Erscheinungsbild der resultierenden Krankheitsbilder läßt sich schlecht oder gar nicht mit dem gespeicherten Material oder gar dem enzymatischen Defekt in Verbindung bringen. Die Ultrastruktur der Speicherlysosomen reicht von lamellaren und quasi kristallinen Strukturen, die auf unverdaute Lipide zurückgehen, über Glykogengranula bis zu wenig strukturiertem Speichermaterial aus kohlenhydratreichem Material. Die Defekte betreffen luminale Enzyme, einzeln oder als ganze Gruppe [z.B. Mucopoliose II (Hasilik *et al.*, 1981, Waheed *et al.*, 1982) und Multiple Sulfatase Defizienz (Schmidt *et al.*, 1995)], membranassoziierte Enzyme, Aktivatorproteine und membranständige Transportsysteme.

### **1.2.1 Die Mucopolysaccharidosen**

Mucopolysaccharide sind in der Grundsubstanz des Bindegewebes in Form von Proteoglykanen oder freien Mucopolysacchariden vorkommende Substanzen (Heparin, Hyaluronsäure, Chondroitin-, Dermatan- und Keratansulfat). Störungen ihres Abbaus führen zu Mucopolysaccharidosen, die zu den lysosomalen Speicherkrankheiten gehören.

Verschiedene spezifische lysosomale Enzyme sind für den Abbau von Dermatansulfat, Heparansulfat oder Keratansulfat einzeln oder in Kombination notwendig. Unvollständig abgebaute Mucopolysaccharide sammeln sich im Gewebe an und werden mit dem Urin ausgeschieden. Die verschiedenen Mucopolysaccharidosen zeigen ein allgemeines klinisches Erscheinungsbild: Veränderungen des Skelettsystems, des zentralen Nervensystems (ZNS), visceraler Organe, der Haut und des Endocards.

Sie beruhen auf einer Störung des enzymatischen Abbaus der sauren Mucopolysaccharide durch die Lysosomen, in welchen sie abgelagert werden (im ZNS zusätzlich Gangliosidablagerung). Gespeichert werden 4 Typen von Mucopolysacchariden, je nach Krankheitstyp mit unterschiedlichem Verteilungsmuster, die Speicherung erfolgt einzeln oder kombiniert.

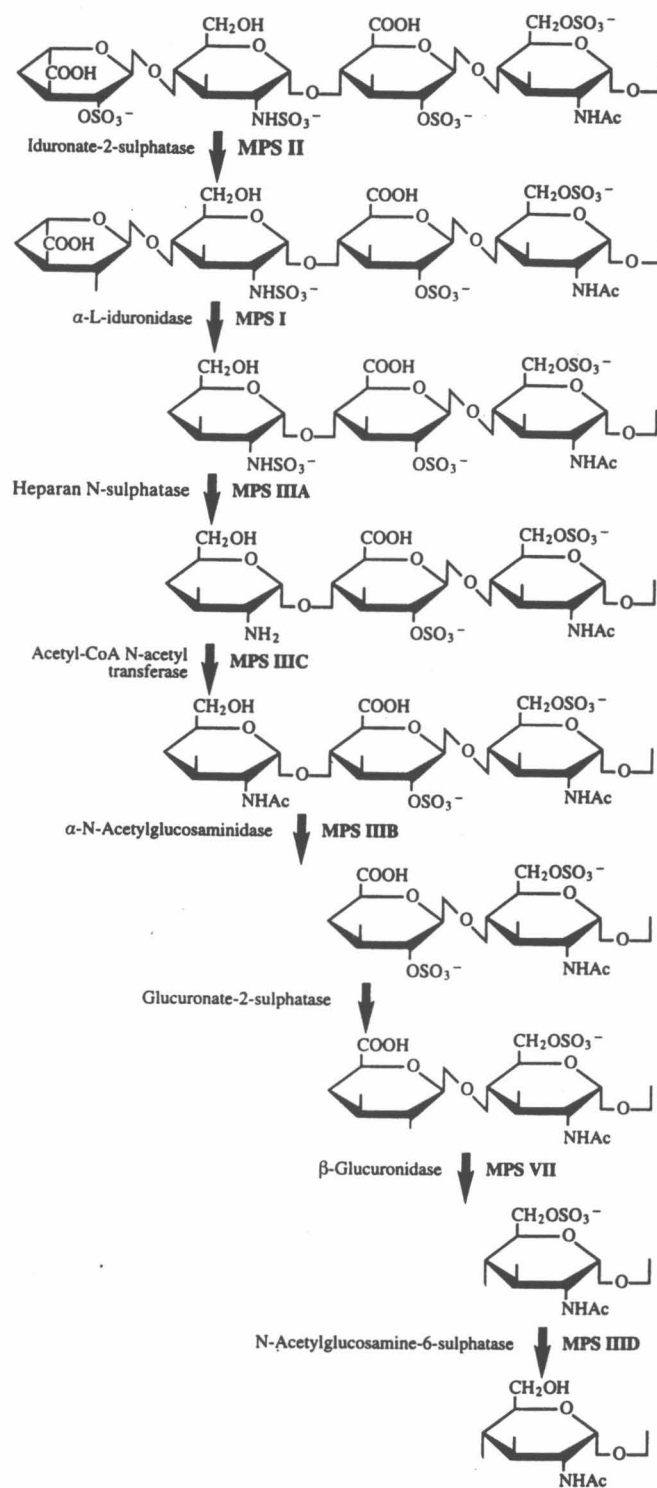


Abbildung 1: Abbau von Heparansulfat

Tabelle 1: Die Mucopolysaccharidosen (nach V.A. McKusick &amp; E.F. Neufeld)

Erkrankung		Vererbung	Enzymdefekt	Gespeicherte Substrate	Klinische Symptome
MPS I	Hurler		$\alpha$ -L-Iduronidase		
MPS II	Hunter	X-gebunden rezessiv	Iduronat-2-sulfatase	HS, DS	variabel, milde bis schwere mentale Retardierung, Skelettveränderungen
MPS III A	Sanfilippo A	autosomal rezessiv	Sulfamidase	HS	variabel, milde bis schwere mentale Retardierung, Skelettveränderungen
MPS III B	Sanfilippo B		N-acetyl- $\alpha$ -D-Glucosaminidase	HS	variabel, milde bis schwere mentale Retardierung, Skelettveränderungen
MPS III C	Sanfilippo C		Acetyl-CoA: $\alpha$ -Glucosaminid-N-Acetyltransferase	HS	variabel, milde bis schwere mentale Retardierung, Skelettveränderungen
MPS III D	Sanfilippo D	autosomal rezessiv	Glucosamin-6-sulfatase	HS	variabel, milde bis schwere mentale Retardierung, Skelettveränderungen
MPS IV A	Morquio A	autosomal rezessiv	Galaktose-6-sulfatase	KS, CS	variabel, milde bis schwere Skelettdeformationen, Überbewegliche Gelenke, Trübung der Cornea
MPS IV B	Morquio B			KS	variabel, milde Skelettdeformationen, Trübung der Cornea
MPS VI	Maroteaux-Lamy	autosomal rezessiv	Arylsulfatase B N-Acetyl-galaktosamin-4-sulfatase	DS, CS	variabel, milde bis schwere Skelettdeformationen, Versteifung der Gelenke, Trübung der Cornea
MPS VII	Sly		$\beta$ -Glucuronidase	DS, HS	Hepatosplenomegalie

CS:Chondriotinsulfat, DS:Dermatansulfat, HS:Heparansulfat, KS: Keratansulfat

Durch spezifische Enzymtests ist eine Identifizierung der verschiedenen Formen der Mucopolysaccharidosen möglich. Für den vollständigen Abbau der Glycosaminoglykane werden, neben den in Tabelle 1 aufgeführten fünf bei MPSII, IIIA, IIID, IVA und VI betroffenen Sulfatasen und der Glucuronat-2-sulfatase, 4 Glycosidasen und eine Acetyl-CoA-Glucosaminid-N-Acetyltransferase benötigt. Von den zehn bekannten menschlichen Sulfatasen sind neun lysosomale Enzyme, während die Steroidsulfatase ein membranständiges mikrosomales Enzym ist. Die biologische Wichtigkeit der Sulfatasen wird deutlich durch das Auftreten von acht unterschiedlichen vererbten Stoffwechselerkrankungen des Menschen, die durch Defizienz spezifischer Sulfatasen charakterisiert sind.

Speicherung von sauren Mucopolysacchariden kommt auch bei der Multiplen Sulfatase Defizienz (MSD) und bei der I-Zellen Erkrankung vor. Während letztere Erkrankung durch einen schon erwähnten Defekt des Segregationssystems lysosomaler Enzyme verursacht wird, ist bei der MSD eine posttranslationale Modifizierung der Sulfatasen defekt. Diese Modifizierung besteht in der Umwandlung von Cystein- zu Formylglycinresten, die für die Entfaltung der katalytischen Aktivität benötigt werden (von Figura *et al.*, 1998).

### 1.2.2 Das Sanfilippo-Syndrom

Das Sanfilippo-Syndrom unterscheidet sich klinisch und biochemisch von den anderen Mucopolysaccharidosen. Es wurden vier biochemisch unterschiedliche Formen identifiziert, die klinisch nicht unterscheidbar sind. Jeder Form fehlt ein spezifisches Enzym, das am Abbau von Heparansulfat beteiligt ist. Biochemisch wird das Sanfilippo-Syndrom durch die Ausscheidung von Heparansulfat im Urin nachgewiesen. In der Schwere der Krankheit wurde ebenfalls eine hohe Variabilität beobachtet. Das übliche klinische Bild ist das eines fortschreitenden Abbaus der Persönlichkeit, dessen offensichtlicher Ausbruch in den ersten Lebensjahren stattfindet, begleitet von milderer somatischen Erscheinungsformen, als bei den meisten anderen Mucopolysaccharidosen. Klinische Symptome wie Hyperaktivität und Schlafstörungen fangen in den meisten Fällen nach zwei bis sechs Jahren normal erscheinender Entwicklung an. Nach oft normalem Einschulen des jungen Patienten treten dann häufig zunächst Verhaltensauffälligkeiten in den Vordergrund, später erfolgt der Verlust der Sprachfähigkeit. Schwere Verhaltensstörungen kombiniert mit unverminderter körperlicher Kraft und zunehmender geistiger Behinderung machen oft eine dauerhafte stationäre Behandlung notwendig. Der Tod tritt meistens durch kardiopulmonale Komplikationen vor Beendigung des zwanzigsten Lebensjahres ein. Ein Patient mit dem Sanfilippo B-Syndrom lebt beispielsweise noch im 33. Lebensjahr.

Zu den wichtigsten Symptomen gehören Deformationen des Skeletts, Versteifungen der Gelenke, Kleinwüchsigkeit und eine Vergrößerung der Gesichtszüge, die bei den milden, adulten Formen nicht auffällig werden. Eine Hornhaut-Trübung wird im Sanfilippo-Syndrom überhaupt nicht beobachtet, Hirsutismus dagegen fast immer. Die Leber- und Milzvergrößerung ist gering, Gelenkversteifungen sind geringer als bei dem Hurler- oder Hunter-Syndrom. Das Herz ist ebenfalls weniger beteiligt als bei den anderen Mucopolysaccharidosen.

Wenn klinische und radiologische Befunde eines Patienten minimal sind und die üblichen Tests für Mucopolysaccharidosen negativ ausfallen, scheint das Sanfilippo-Syndrom die am häufigsten nicht bzw. spät diagnostizierte Mucopolysaccharidose zu sein.

Obwohl die Sanfilippo-Formen klinisch nicht unterscheidbar sind, kommt die Gruppe Typ A offenbar am häufigsten vor. Die Patienten der Gruppe B und C werden meistens später erkannt, da die Symptome selten vor dem vierten Lebensjahr auftreten, und leben dann länger; der älteste Patient mit dem Typ B wurde 43 Jahre alt.

### 1.2.3 Die Acetyl-Coenzym A: $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase

Der Defekt der Acetyl-Coenzym A:  $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase führt beim Menschen zum Sanfilippo Syndrom Typ C (Mucopolysaccharidose III C). Diese Stoffwechselerkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und geht mit einer verstärkten Ausscheidung von Heparansulfat im Urin der Patienten einher. Klinische Befunde sind schwere progressive mentale Retardierung sowie eine Vielzahl äußerlicher Symptome des Sanfilippo-Syndroms, die durch eine Speicherung von Heparanbruchstücken verursacht sind. Eine Zuordnung äußerlicher Symptome zu einem bestimmten Erkrankungstyp ist nicht möglich, da die Symptome bei allen Sanfilippo-Formen gleich sind, bzw. stark variieren. Patienten mit dieser Störung häufen Heparansulfat in den Lysosomen verschiedener Gewebe an und scheiden extreme Mengen an Heparansulfat-Fragmenten mit dem Urin aus (Klein, Kresse, von Figura, 1978).

Der Abbau von Heparansulfat im Lysosom erfolgt durch die konzertierte Aktion von mindestens acht Enzymen (Abbildung 1). Diese umfassen vier Sulfatasen, drei Exoglycosidasen und die o.g. Acetyltransferase. Diese Enzyme agieren sequentiell am nicht reduzierenden Ende der Heparansulfatkette und setzen Sulfat und Monosaccharide frei, welche durch Transportsysteme ins Cytosol gelangen. In diesem Prozess ist die Acetyltransferase notwendig, um N-terminale Glucosaminreste zu acetylieren, wodurch die folgende Reaktion der  $\alpha$ -N-Acetyl-Glucosaminidase ermöglicht wird. Das Enzym überträgt dabei von cytosolischem Acetyl-CoA eine Acetyl-Gruppe durch die lysosomale Membran auf Heparansulfat. Die Aufnahme von exogen zugeführtem Acetyl-CoA in intakten isolierten Lysosomen wurde von Crain und Rome *et al.* (1982) nachgewiesen. Diese Reaktion stellt einen essentiellen Zwischenschritt im Heparansulfat-Abbau dar, dessen Ausfall im Falle des



erblichen Defektes im Sanfilippo C-Syndrom zur lysosomalen Speicherung von Heparansulfat führt.

Die Notwendigkeit einer biosynthetischen Reaktion in einem katabolen Prozess ist selten und stellt eine Besonderheit des lysosomalen Stoffwechsels dar. Zudem nimmt dieses Enzym daher eine Sonderstellung im Transportsystem ein:

Die Acetyltransferase ist wahrscheinlich ein integrales Membranprotein und es wurde ein transmembraner Acetylierungsmechanismus postuliert. Der Reaktionsmechanismus wurde von Bame & Rome untersucht (1985). Als Ausgangsmaterial wurden gereinigte lysosomale Membranen aus Rattenleber verwendet. Um die Enzymreaktion zu verfolgen, wurde die Acetylierung von Glucosamin, einem Monosaccharid-Akzeptor, gemessen. Die AT hat ein breites pH-Optimum von pH 6-8 (Crain *et al.*, 1982). Inhibitorstudien weisen daraufhin, dass das Enzym nach einem Di-Iso Ping Pong Bi Bi Mechanismus funktioniert. Eine Hemmung der Enzymaktivität wurde durch N-Bromosuccinimid (NBS) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) nachgewiesen (Bame & Rome, 1986).

Weitere Nachweise, um den transmembranen Acetylierungsmechanismus zu bestätigen, lieferten die Charakterisierung der Teil-Reaktionen des Enzyms durch radioaktive Markierungen. Membranen, die mit Acetyl-CoA und  $^3\text{H}$ -CoA inkubiert wurden, produzierten Acetyl- $^3\text{H}$ -CoA. Dieser Austausch war optimal bei pH-Werten über 7,0. Die Behandlung der Membranen mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA hingegen resultierte in der Bildung eines radioaktiven Acetyl-Enzym-Intermediates. Der Transfer der Acetyl-Gruppe vom Enzym zum Glucosamin war optimal zwischen pH 4 und 5. Diese Ergebnisse zeigen, daß Acetyl-CoA nicht die lysosomale Membran durchquert. Die Acetyltransferase ist auf der cytoplasmatischen Seite des Lysosoms acetyliert, die Acetyl-Gruppe wird zur Innenseite transferiert und acetyliert dort Heparansulfat.

Der Transfer einer Acetyl-Gruppe läßt auf die Beteiligung einer Thiol-Gruppe (Cystein), Hydroxyl-Gruppe (Serin, Thyrosin), Amino-Gruppe (Lysin), oder einer Nitro-Ringstruktur (Tryptophan, Histidin) schließen. Versuche mit Reagenzien die Cystein, Tyrosin, Lysin, Tryptophan und Histidin modifizieren, deuten darauf hin das es sich hier um einen essentiellen Histidin-Rest an der aktiven Seite der AT handelt (Bame & Rome, 1986).

### 1.3 Die lysosomale Membran

Die lysosomale Membran stellt nicht nur eine physikalische Barriere zwischen dem Cytosol und dem lysosomalen Verdauungsinhalt dar, sondern reguliert auch die Zusammensetzung dieses Inhaltes, um so die optimale Verdauung von Makromolekülen zu gewährleisten.

J. Burnside und D.L. Schneider zeigten 1982 als erste, daß sich die Proteinzusammensetzung dieser Membran deutlich von der Plasmamembran unterscheidet. Sie beobachteten als Hauptproteinbestandteile hochglykosylierte Strukturproteine mit einem Molekulargewicht von 90-110 kDa. Diese Proteine wurden je nach Spezies und Autor verschieden benannt:

LAMP	<u>L</u> ysosomal <u>A</u> ssociated <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein
lgp	<u>L</u> ysosomal <u>G</u> lyco- <u>P</u> rotein}
LEP	<u>L</u> ysosome- <u>E</u> ndosome- <u>P</u> lasma membrane
LIMP	<u>L</u> ysosomal <u>I</u> ntegral <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein

und seitdem in nachfolgenden Spezies definiert:

Maus	Chen <i>et al.</i> , 1985
Ratte	Lewis <i>et al.</i> , 1985, Barriocanal <i>et al.</i> , 1986, Croze <i>et al.</i> , 1989
Huhn	Lippincott-Schwartz <i>et al.</i> , 1986
Mensch	Carlsson <i>et al.</i> , 1988, Mane <i>et al.</i> , 1989, Review: Peters & von Figura, 1994

Eine vermutete Funktion dieser Proteine ist der Schutz der restlichen Membran-Komponenten vor vorzeitigem Abbau durch Ausbildung einer dichten Glycocalix. Durch Sequenzvergleiche lassen sich zwei verwandte Proteingruppen, LAMP-1 und LAMP-2, identifizieren, die zwischen verschiedenen Tierspezies höhere Homologie aufweisen als untereinander (Fukuda *et al.*, 1988). Nach der Nomenklatur von W.T. Wickner und H.F. Lodish (1985) handelt es sich um Membranproteine vom Typ I. Nicht verwandt mit diesen beiden sind humanes LIMP I (identisch zu CD63 und ME491/Metzelaar *et al.*, 1991) und LIMP II der Ratte (Vega *et al.*, 1991). LIMP I und II sind kleiner (30-50 kDa bzw. 74 kDa), schwächer glykosyliert und Membranproteine vom Typ III. Die Zielsteuerung dieser Proteine in die Lysosomen erfolgt Mannose-6-Phosphat-unabhängig über ein Sequenzsignal in der cytoplasmatischen Domäne. LAMP-1 und -2 und LIMP I (ebenso wie die saure lysosomale Phosphatase) enthalten dort ein Glycin-Tyrosin Motiv, welches für die Internalisierung und lysosomale Lokalisation essentiell ist (Review: Peters & von Figura, 1994). LIMP II scheint dagegen

über ein C-terminales Leucin-Isoleucin-X-Motiv sortiert zu werden (Ogata und Fukuda, 1994, Sandoval *et al.*, 1994).

Daneben erwartet man in deutlich geringerer Häufigkeit noch schlecht charakterisierte Proteine mit spezifischeren Aufgaben, wie z.B. der Steuerung von Fusionsprozessen mit endosomalen Vesikeln (Sollner *et al.*, 1993, Review: Rothman und Wieland, 1996) oder der Koordinierung des Vorgangs der Autophagozytose. Weitere Proteine, die mit dem Cytoskelett in Verbindung stehen und dadurch möglicherweise eine bestimmte Verteilung der Lysosomen innerhalb der Zelle ermöglichen, wurden von M. Mehrabian *et al.* (1984) und G. Mithieux *et al.* (1989) beschrieben. Die größte Gruppe nehmen die Transportproteine ein, die den Ausstrom und Import diverser Moleküle ermöglichen und dadurch die Permeabilitätseigenschaften der lysosomalen Membran definieren (Pisoni, R.L. *et al.*, 1987, Review: Forster und Lloyd, 1988).

### **1.3.1 Defekte der integralen lysosomalen Membranproteine**

Die Erforschung der lysosomalen Membrankomponenten ist nicht zuletzt deshalb von Interesse, weil ein Teil der lysosomalen Speicherkrankheiten ihre Ursachen in einem Defekt verschiedener Transportsysteme in der Membran haben, die bis heute ausschließlich hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität charakterisiert worden sind.

## **1.4 Reinigung lysosomaler Membranproteine**

Das gebräuchlichste Gewebe zur Gewinnung von Lysosomen ist die Rattenleber, da sie leicht erhältlich ist. Für die Reinigung der Lysosomen wurden verschiedene Methoden entwickelt, wobei nach einer differentiellen Zentrifugation zur Abtrennung der Zellkerne die Lysosomen aufgrund ihrer charakteristischen Dichte in verschiedenen Gradiententypen wie Metrizamid (Wattiaux *et al.*, 1978, de Duve *et al.*, 1955), Saccharose (Dobrota *et al.*, 1980) und Percoll (Wolff und Pertoft 1972, Rome *et al.*, 1979, Jonas *et al.*, 1980) abgetrennt werden.

Vorherige, spezifische Änderung der Dichte von Mitochondrien (Lardeaux *et al.*, 1983), als Hauptkontaminanten, und der Lysosomen (Trouet 1964, Leighton *et al.*, 1968) erwies sich ebenfalls als erfolgreich. Andere Reinigungs-Schemata beinhalteten die Trennung der

Lysosomen über Sepharose gebundenes *Ricinus communis* Agglutinin (Kamrath *et al.*, 1984) oder über "free-flow"-Elektrophorese (Stahn *et al.*, 1970).

In den letzten Jahren wurden von einigen Membranproteinen der Ratte die Sequenzdaten ermittelt, die auch die Aufklärung der humanen Homologe ermöglichen sollten. Neben LAMP-1 und LAMP-2, deren Homologe auch in Mensch, Huhn und Maus gefunden wurden, wurden folgende Membranproteine in der Ratte sequenziert: LIMP II (Fujita *et al.*, 1992, Vega *et al.*, 1991), Flavin-Adenin Dinucleotid Phosphohydrolase (Kim *et al.*, 1993), Dipeptidyl Peptidase IV (Kyounden *et al.*, 1992) und eine  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  abhängige ATPase (Ezaki *et al.*, 1992).

Im Menschen sind bisher nur die Primärstrukturen von folgenden lysosomalen Membranproteinen bekannt: Die der o.g. Glykoproteine h- LAMP-1, h-LAMP-2 (Fukuda *et al.*, 1988), der Thrombozyten Aktivierungsmarker CD-63/LIMP I (Metzelaar *et al.*, 1992) und LIMP II (Fujita *et al.*, 1991). Desweiteren wurden mehrere Untereinheiten der vakuolären, protonenpumpenden ATPase sequenziert (van Hille *et al.*, 1993/1995), womit das erste Peptid eines Transportproteins der lysosomalen Membran kloniert wurde.

## 2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Acetyl-CoenzymA:  $\alpha$ -Glucosaminid-N-Acetyltransferase (AT) in humanen lysosomalen Membranen.

- 1.) Mit tritiummarkiertem Acetyl-Coenzym A soll die AT in affinitätsgereinigten lysosomalen Membranen aus humaner Placenta markiert werden. Eine wichtige Voraussetzung ist, daß das von Rome *et al.* postulierte acetylierte Intermediat der AT während der Proteintrennung stabil bleibt. Mit ein- und zweidimensionaler Elektrophorese sollen eventuell markierte Polypeptide aufgetrennt werden und das Molekulargewicht und deren isoelektrische Punkte bestimmt werden.
- 2.) Zur weiteren Überprüfung soll diese Markierung mit affinitätsgereinigten Membranen aus Sanfilippo C-Fibroblasten mit dem genetischen AT-Defekt und humanen Fibroblasten ohne genetischem Defekt verglichen werden.
- 3.) Zur Anreicherung der AT, u.a. durch säulenchromatographische Methoden, soll ein Enzym-Assay etabliert werden.
- 4.) Die Solubilisierung der AT in enzymatisch aktiver Form sollte weitere Anreicherungsschritte ermöglichen.
- 5.) Ein weiteres Ziel besteht in der Bestimmung des isoelektrischen Punktes des aktiven Enzyms um damit den pH-Bereich für die zweidimensionale Trennung zu ermitteln.
- 6.) Durch Auftrennung der angereicherten Säulenfraktion in der zweidimensionalen Elektrophorese sollen durch Vergleich mit den als lysosomal identifizierten Proteine mögliche Kandidaten für das gesuchte Enzym eingegrenzt werden.
- 7.) Durch chemische Modifikation des Enzyms soll im zweidimensionalen Gelelektrophorese-Bild eine weitere Eingrenzung der Kandidaten erfolgen.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte und Zubehör

Elektrophoresekammern	Eigenbau der Institutswerkstatt
Elisaplatten	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Gammazähler	Berthold, BF 5300 Gammazint, Wildbad
Immobiline Gel Streifen	Pharmacia Biotech, Freiburg i.Br.
L7-65 Ultrazentrifuge	Beckman Instruments GmbH, Frankfurt
MR 1822 Jouan Kühlzentrifuge	Jouan GmbH, Unterhaching
Phosphor Imager SI	Molecular Dynamics, Krefeld
Quellkammer für Immobiline-Gel-Streifen mit den Innenabmessungen $113 \times 3,3 \times 0,6$ mm	Eigenbau der Institutswerkstatt
Quick-Seal-Röhrchen (12,5 und 40 ml)	Beckman Instruments GmbH, Frankfurt
Szintillationszähler	Packard 1600 TR Packard-Canberra, Dreieich
T 45 Ultrathurax	Jahnke u. Kunkel GmbH, Staufen i.Br.
Ultraschallbad	Laboratory Supplies C., Inc., Typ G112SP1T, Hicksville (USA)
Wanne zur isoelektrischen Fokussierung und Halterung mit Platinelektroden	Eigenbau der Institutswerkstatt

#### 3.2 Chemikalien

ABTS [2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)]	Boehringer-Mannheim, Mannheim
Acetyl-CoenzymA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
$^3\text{H}$ -Acetyl-CoenzymA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ampholyte pH 3,5-10	Serva, Heidelberg
Antifoam A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DEPC	Serva, Heidelberg
Eupergit-C1Z	Röhm Pharma GmbH, Weiterstadt
Fötiales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

$^3\text{H}$ -(6)-Glucosamin-Hydrochlorid	Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig
Hank's buffered salt solution (Hank's)	Gibco-BRL, Eggenstein
Lactalbuminhydrolysat	Roth, Karlsruhe
Minimum essential medium (MEM)	Gibco-BRL, Eggenstein
mit Earle's Salzen, L-Glutamin und nicht-essentiellen Aminosäuren	
NBS	Serva, Heidelberg
Nutridoma XS100	Boehringer-Mannheim, Mannheim
Paraffin, dünnflüssig	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin Stammlösung	Gibco-BRL, Eggenstein
Proteinnachweis-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ziege anti Maus IgG gekoppelt an Meerrettichperoxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Alle übrigen Chemikalien wurden von verschiedenen Anbietern bezogen und waren vom Reinheitsgrad " zur Analyse" (p.a.).

### 3.3 Standardlösungen

TBS:	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl pH 7,4

## 4 Methoden

### 4.1 Präparation von Lysosomen aus humaner Placenta

#### 4.1.1 Herstellung des Organellenkonzentrats

##### Lösungen:

Puffer H (Homogenisierungs-Puffer):	10 mM	Triethanolamin
	10 mM	Eisessig
	250 mM	Saccharose
	10 mM	EDTA
	pH 7,2	mit NaOH eingestellt

Frische humane Placenta wurde aus umliegenden Krankenhäusern bezogen und möglichst schnell nach der Geburt auf Eis gestellt. Die gesamte weitere Aufarbeitung erfolgte mit Eiskühlung bzw. bei 4°C im Kühlraum mit vorgekühlten Puffern und Geräten. Alle Zentrifugationsschritte verliefen ebenfalls bei 4°C. Das Trophoblastengewebe wurde von dem restlichen festeren Gewebe und der Nabelschnur mit einem Messer abgeschabt oder geschnitten. Nach einer groben Zerkleinerung (ca. 2×2×2 cm<sup>3</sup>- Stücke) wurde das Gewebe dreimal mit 500 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Fleischwolfs zerkleinert. Das Gewicht betrug jetzt ca. 250 - 300 g. Hierzu wurde 0,25 l Puffer H gegeben und das Gemisch 4 mal 5 sec. mit einem Ultrathurrax homogenisiert.

Dieses Homogenat wurde zur Gewinnung eines postnukleären Überstandes (P.N.Ü.) 10 min in einem GSA-Rotor bei 4 000 Upm (3 000 × g) zentrifugiert. Von dem P.N.Ü. wurden maximal 300 ml weiterverarbeitet und in TV-860-Zentrifugenbecher verteilt, in denen mit je 2,4 ml Percolllösung (Dichte 1,075 g/ml) unterschichtet wurde. Die Zentrifugation erfolgte in einem SS-34 Rotor von Sorvall für 15 min bei 20 000 Upm (32 000 × g). Der Überstand wurde vorsichtig über das Pellet abgegossen und verworfen. Die Pellets sollten nach Vereinigung ein Volumen von 40 ml haben und stellten das Organellenkonzentrat dar.



Wenn nötig, wurde das Volumen mit Puffer H auf 40 ml erhöht und anschließend in einem Potter-Homogenisator mit 3 kräftigen Stößen homogenisiert.

#### 4.1.2 Fraktionierung des Organellenkonzentrats

Mit Hilfe eines Zwei-Stufen-Percolldichtegradienten nach D.A. Wolff und H. Pertoft (1972), modifiziert durch L.H. Rome *et al.* (1979), wurde die Abtrennung der schweren lysosomalen Vesikel erreicht. Dazu wurde in vier Sorvall " Ultracrimp" Zentrifugenröhrchen aus Polyallomer jeweils folgender Gradient durch Übersichtung mittels einer Peristaltikpumpe aufgebaut:

10 ml	Organellenkonzentrat
14 ml	Percolllösung der Dichte 1,075 g/ml in Puffer H
8 ml	Percolllösung der Dichte 1,090 g/ml in Puffer H
3 ml	Puffer H mit zusätzlich 1,75 M Saccharose

Die Gradienten wurden 30 min bei 21 000 Upm ( $34\,000 \times g$ ) in einem TV 860-Rotor zentrifugiert, wobei der Bremsvorgang nur bis auf 600 Upm erfolgte; danach lief der Rotor bremsfrei aus. Mit Hilfe eines Fraktioniergerätes wurde von oben flüssiges Paraffin in die Röhrchen gedrückt, so daß unten 17 Fraktionen à 2 ml abgenommen werden konnten.

In allen Fraktionen wurde nun die  $\beta$ - Hexosaminidase-Aktivität und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität enthielten die dichten lysosomalen Vesikel und wurden gepoolt. Dies waren in den meisten Fällen die Fraktionen 2-5 (von unten gezählt). Dieser " dichte Pool" wurde zur späteren Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Um ein schnelles schockartiges Einfrieren zu gewährleisten und um später problemlos kleine Mengen des "dichten Pools" abnehmen zu können, wurde er tröpfchenweise in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff gegeben, so daß kleine ca. 50  $\mu$ l enthaltende gefrorene Kügelchen entstanden. Die Lagerung erfolgte bei  $-70\,^{\circ}\text{C}$ .

## 4.2 Proteinase-Inhibitoren

Für alle weiteren Versuche mit dem " dichten Pool" wurden während des Auftauens der Kügelchen aus dem " dichten Pool" folgende Konzentrationen von Proteinase-Inhibitoren zugegeben:

1 $\mu$ M	Leupeptin
1 $\mu$ M	Pepstatin
1 $\mu$ M	Carbobenzoxycarbonyl-L-Phenylalanyl-L-Phenylalanyl -D-Diazomethan
1 mM	PMSF

## 4.3 Membranpräparation durch Ultrazentrifugation

Aliquots des "dichten Pools" von 0,5 ml wurden 10-fach mit 10 mM Tris-HCl pH 7,4 verdünnt und bei 4 °C für 2 Stunden mit 38 000 Upm ( $183\,000 \times g$ ) in einem Sorvall TV860-Rotor zentrifugiert. Die Membranen, die als dünne bräunliche Schicht über der Percollphase schweben, wurden in 0,1 ml abgezogen und mit 1,3 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,4 verdünnt. Anschließend wurde diese Probe für 2 Stunden bei 38 000 Upm ( $125\,000 \times g$ ) in einem Sorvall TV860-Rotor mit Adaptoren für Eppendorf-Reaktionsgefäße in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet (30  $\mu$ l) wurde für weitere Versuche verwendet oder in 10  $\mu$ l Aliquots bei -70 °C gelagert.

## 4.4 Membranpräparation durch Immunoadsorption aus " dichtem Pool"

Zu 250  $\mu$ l "dichtem Pool" wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 25  $\mu$ l einer Suspension von h- LAMP 2-spezifischem Antikörper (2D5) gekoppelt an Eupergit-C1Z-Perlen gegeben. Die Suspension wurde für 5 sec in ein effizientes Ultraschallbad getaucht und bei 4 °C für 4 Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Die Probe wurde mit 0,5 ml eiskaltem 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl (TBS) aufgefüllt und anschließend in einem Festwinkel-Rotor mit 7,4 cm Radius in einer MR 1822 Jouan Zentrifuge bei 4 °C mit

voller Beschleunigung für 35 sec und minimaler Bremskraft zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in 1 ml TBS suspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die folgende Zentrifugation erfolgte analog der ersten, die Beschleunigungsphase wurde auf 30 sec verkürzt. Der Überstand wurde wieder verworfen und der Niederschlag für folgende Versuche bei 4 °C oder für längere Zeit bei -70 °C aufbewahrt.

#### **4.4.1 Anreicherung lysosomaler Membranproteine**

Eine Untersuchung der spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Markerproteine ergab eine deutliche Zunahme der Reinheit der lysosomalen Membranen nach der Immunoaffinitäts-Reinigung. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, wurden alle vier lysosomalen Markerproteine angereichert. Da die lysosomalen Proteine bei der Affinitätsmethode eine höhere Reinheit aufweisen, wurde zu weiteren Versuchen fast ausschliesslich diese Methode verwendet.

*Tabelle 2: Anreicherung lysosomaler Membranen aus dem "dichten Pool" durch Ultrazentrifugation und Immunoaffinitäts-Reinigung (Dissertation Ole Diettrich, 1996).*

	Anreicherungs-Faktor gegenüber dem "dichten Pool" der Membranpräparationen		Verhältnis der Anreicherungs- Faktoren
	durch Ultra- zentrifugation	durch Immunoaffinitäts- Methode	Immunaфф. / Ultrazentr.
Lysosomale Membran-Komponenten:			
h LAMP-2	2,6	7,4	2,8
CD63/LIMP II	1,9*	7,8*	4,1*
$\beta$ -Glucosidase	1,3 (158)	4,5 (524)	3,5
Acetyl-Transferase	3,0* (14)	6,6* (38)	2,5
Andere Marker:			
Succinat Dehydrogenase	2,8 (67)	1,1 (26)	0,39
$\beta$ -N-Acetyl Hexosaminidase	0,2 (1440)	0,041 (168)	0,20
$\beta$ -Glucuronidase	1,0 (106)	0,032 (3,58)	0,032
$\alpha$ -Glucosidase	0,066 (0,52)	0,038 (0,32)	0,058
* Alle Werte sind Mittelwerte aus zwei Placenta-Präparationen mit Ausnahme derer, die mit einem Sternchen versehen sind, welche von nur einer Aufarbeitung stammen. Die Werte in Klammern stellen die durchschnittlichen spezifischen Enzym-Aktivitäten in Units/g dar.			

## 4.5 Subzelluläre Fraktionierung humaner Fibroblasten

### 4.5.1 Zellkultur

Humane Hautfibroblasten wurden in MEM mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin in einer 5 %ig CO<sub>2</sub> -Atmosphäre bei 37 °C kultiviert.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit neuem Medium versorgt und je nach Wachstum alle ein bis zwei Wochen trypsiniert und gesplittet. Humane Hautfibroblasten mit genetischen Defekten sind schwieriger zu kultivieren und wachsen langsamer. Es wurde zusätzlich 1% (w/v) Nutridoma ins Medium gegeben um ihr Wachstum zu fördern und sie am Leben zu erhalten.

#### 4.5.2 Zellernte

##### Lösungen:

Puffer A:	250 mM	Saccharose
	1 mM	Na-EDTA pH 7,4
Puffer B:	250 mM	Saccharose
	3 mM	Imidazol-HCl, pH 7,4

Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4 °C oder auf Eis. Das Medium wurde verworfen und der Zellrasen zweimal mit Hank's und einmal mit Puffer A gewaschen. Die Zellen wurden in zweimal 0,5 ml Puffer B abgeschabt und mit 20 Stößen eines 1 ml Glass/Glass- Dounce“-Homogenisierers aufgeschlossen. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Homogenisierer mit 0,4 ml Puffer B nachgespült. Beide Suspensionen wurden vereinigt und zur Abtrennung der Zellkerne und intakten Zellen für 10 min in einem Rotor mit 7,4 cm Radius in einer MR 1822 Jouan Zentrifuge bei 3 000 Upm ( $600 \times g$ ) zentrifugiert. Es wurden 1 300 µl postnukleärer Überstand abgenommen.

#### 4.5.3 Die postnukleäre Trennung subzellulärer Partikel im Percoll-Gradienten

Der Überstand kam auf einen Ein-Stufen-Gradienten in 12,5 ml Quick-Seal-Röhrchen folgenden Aufbaus:

1,3 ml	Postnukleärer Überstand
10,2 ml	Percolllösung der Dichte 1,080 g/ml in Puffer H (siehe 4.1.1)
1 ml	Puffer H mit zusätzlich 1,75 M Saccharose

Für verschiedene Zelllinien und Percoll-Chargen wurde die Dichte der Percoll-Lösungen so gewählt, daß die Peak-Höhe der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität in der "leichten" und der "schweren" Vesikel-Population ungefähr gleich waren. Nach dem Zuschmelzen des Quick-Seal-Gradienten-Röhrchens wurde bei 21 000 Upm ( $36\,000 \times g$ ) in einem Rotor des Typs Beckman VTi 65.1 für 30 min und mit freiem Auslauf des Rotors zentrifugiert. Für die Fraktionierung wurde das Röhrchen aufgeschnitten, eine Glaskapillare vorsichtig bis zum Boden eingeführt und über diese der Inhalt abgepumpt und in 20 Fraktionen zu je 600  $\mu$ l aufgefangen. Die Bestimmung der Aktivität der sauren  $\beta$ -Hexosaminidase ermöglicht einen Bereich des Gradienten auszuwählen, der in 10 - 30-facher Anreicherung schwere Lysosomen enthält, für die dieses Enzym ein Marker ist (üblicherweise die Fraktionen 3-6).

#### **4.5.4 Affinitätsreinigung lysosomaler Fibroblasten-Membranen**

Die Fraktionen 3 - 6 eines Percoll-Gradienten (4.5.3) wurden vereinigt, mit Proteinase-Inhibitoren versetzt und wieder auf 4 Reaktionsgefäße à 600  $\mu$ l verteilt. Jedes Gefäß erhielt jetzt 10  $\mu$ l der 2D5-C1Z-Suspension. Nach kurzem Mischen wurden die Gefäße für ca. 5 sec in ein gut spritzendes Ultraschallbad getaucht. Dann erfolgte eine 4 - 6 stündige Inkubation auf einem Drehrad im Kühlraum (ca. 4 - 8 °C). Die Gefäße wurden im Eisbad mit 600  $\mu$ l eiskaltem TBS pH 7,4 auf das doppelte Volumen gebracht, damit das C1Z sedimentieren kann. Dann erfolgte eine Zentrifugation in der 'Jouan'-Zentrifuge: 4 °C, 74 mm Rotor, 30 sec bei maximaler Beschleunigung und minimaler Bremskraft. Die Zentrifuge erreichte dabei eine Geschwindigkeit von 12 000 Upm. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml TBS pH 7,4 unter denselben Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Die Pellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

### **4.6 Markierung von lysosomalen Membranen mit $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA**

#### **4.6.1 Markierung von durch Ultrazentrifugation angereicherten Membranen**

Durch Ultrazentrifugation erhaltene lysosomale Membranen aus humaner Placenta wurden mit TBS auf eine Protein-Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt.

Für einen 50 µl-Markierungsansatz wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 4 °C zusammenpipettiert und vermischt:

- 10 µl lysosomale Membranen
- 36 µl 0,9 % NaCl
- 2 µl 0,5 M Na-Phosphat-Puffer pH 6,8
- 10 µl <sup>3</sup>H-Acetyl-CoA 100 µCi, 7-30 Ci/mmol

Nach 15 minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl TBS gestoppt und sofort mit Methanol-Chloroform (siehe 4.8.3) gefällt. Das so erhaltene Pellet wurde in 30 µl SDS-Gel Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt, dann mit 100 µl 8 M Harnstoff versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert, 2 min bei 14 000 Upm zentrifugiert, der Überstand wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen.

#### 4.6.2 Markierung von durch Immunoabsorption angereicherten Membranen

Lysosomale Membranen aus humaner Placenta wurden nach der Immunoabsorption zusammen mit den Affinitätsperlen in TBS aufgenommen, um eine Protein-Konzentration von 1 µg/µl zu erreichen. Für einen 50 µl-Markierungsansatz wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 4 °C zusammenpipettiert und vermischt:

- 10 µl lysosomale Membranen (ca. 10 µg Protein mit 5-6 mU β-Glucosidase)
- 28 µl 0,9 % NaCl
- 2 µl 0,5 M Na-Phosphat-Puffer pH 6,8
- 10 µl <sup>3</sup>H-Acetyl-CoA 100 µCi [spez. Aktivität 7-30 Ci/mmol]

Nach 1-15 minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml TBS gestoppt und die unspezifische Radioaktivität sofort bei 14 000 Upm in der Eppendorf-zentrifuge herausgewaschen. Das so erhaltene Pellet wurde in 30 µl SDS-Gel Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt, dann mit 100 µl 8 M Harnstoff versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert, 2 min bei 14 000 Upm zentrifugiert, der Überstand wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen. Bei den Zeitabhängigkeitsversuchen wurde nur die Inkubationszeit variiert.

#### **4.7 Solubilisierung von lysosomalen Membranen**

Durch Ultrazentrifugation angereicherte lysosomale Membranen (Protein-Konzentration ca. 1 µg/µl) wurden mit Extraktionspuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 % TX-100 pH 7,0 (w/v)) auf das 4-fache Volumen aufgefüllt. Durch Immunoabsorption angereicherte lysosomale Membranen wurden in 10 µl Aliquots mit jeweils 50 µl Extraktionspuffer solubilisiert und danach gepoolt. Die Proben wurde nun ca. 30 min im Kühlraum langsam rotierend solubilisiert und dann 60 min in dem Sorvall TV860-Rotor mit Adaptoren für Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 38000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit Inhibitoren versetzt und mit 10 mM Tris-Puffer pH 7,0 auf eine Endkonzentration von 1 % TX-100 (w/v) verdünnt und nach Aktivitätsbestimmung sofort für weitere Versuche verwendet.

#### **4.8 Enzymaktivitäts- und Proteinbestimmungen**

##### **4.8.1 Hydrolasen**

Die zu bestimmenden Proben wurden verdünnt mit 0,1 % (w/v) BSA, 0,9 % (w/v) NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,4. Unter Verwendung der entsprechenden p-Nitrophenylverbindungen wurden die Aktivitäten der sauren β- Hexosaminidase (EC 3.2.1.52), der sauren β- Glucosidase (EC 3.2.1.45) und der sauren β- Glucuronidase (EC 3.2.1.31) nach der Methode von v. Figura (1977) gemessen.

##### **4.8.2 Acetyl-Coenzym A: α-Glucosaminid N-Acetyltransferase**

Für die Bestimmung der Aktivität der Acetyl-Coenzym A: α-Glucosaminid N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.3) wurde folgender radioaktiver Assay auf Kationenaustauscherbasis etabliert:

Es wurden kleine Glassäulchen mit einem Durchmesser von 0,5 cm (Pasteurpipetten) mit etwas Glaswolle gefüllt und dann mit vorgequollenem SP-Sephadex C 25 ca. 1,5 cm hoch gefüllt und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 40 µl durchgeführt.



#### Probenvorbereitung:

pro Ansatz wurden folgende Lösungen bei 4°C zusammenpipettiert und 45 in bei RT inkubiert:

- 8 µl Acetyl-Transferase-Puffer (10 mM Acetyl Coenzym A -Trilithiumsalz,  
10 mM Natrium-Phosphat pH 6.8, 1 % Triton X-100 (w/v))
- 10 µl <sup>3</sup>H-Glucosamin-Hydrochlorid, 10 µCi [spez. Aktivität 22 Ci/mmol]
- 2 µl H<sub>2</sub>O
- 20 µl Enzymprobe (z.B. 5 µl "dichter Pool", Proteinkonzentration ca. 0,5 mg/ml)

Durch Zugabe von 1 ml H<sub>2</sub>O wurde die Reaktion gestoppt und die Probe direkt über die Säule gegeben. Dann wurde die Säule dreimal mit 0,5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, und das Eluat mit 2,5 ml Szintillationscocktail versetzt und die Aktivität im Szintillationsgerät gemessen.

#### 4.8.3 Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen

Zu 100 µl Proteinprobe wurden 400 µl 100 %iges Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl H<sub>2</sub>O gegeben, gevortex und 1 min bei 14 000 Upm zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen und die untere Phase mit 300 µl Methanol aufgenommen und gemischt und dann 2 min bei 14 000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet nach Bedarf weiter verarbeitet.

#### 4.8.4 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden die zu bestimmenden Proben mit 0,25 M NaOH, 0,025 % (w/v) TX 100 verdünnt und 1 min bei 14 000 Upm zentrifugiert. Im Falle von Percollhaltigen Proben erfolgte eine Präzipitation des Percolls durch das TX 100. Im Falle von C1Z-haltigen Proben wurden durch die Zentrifugation die C1Z-Perlen abgetrennt. 20 µl des Überstandes wurden in eine Microtiterplatte gegeben und mit 300 µl des 1:5 verdünnten Bio Rad Proteinnachweis-Reagenz ergänzt. Die Extinktion wurde 5 min später bei 630 nm mit 405 nm als Referenzwellenlänge gemessen und mit Hilfe eines BSA-Standards in die Proteinkonzentration der Ausgangsprobe umgerechnet.

## **4.9 Anreicherung der Acetyl-CoA: $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase**

### **4.9.1 Säulenchromatographie**

Die durch Ultrazentrifugation oder Immunoabsorption angereicherten lysosomalen Membranen wurden solubilisiert. Der so erhaltene Solubilisierungsextrakt wurde weiter aufgereinigt, wobei Chromatographien an der FPLC bei RT, ansonsten alle folgenden Schritte bei 4 °C durchgeführt wurden. Puffer für die Chromatographie an der FPLC wurden sterilfiltriert, entgast und gekühlt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf eine FPLC-Säule 10 min bei 1 0000 g zentrifugiert. Alle Reinigungsschritte nach der Solubilisierung wurden möglichst schnell durchgeführt, wobei die Proteinproben bei 4 °C gehalten wurden.

### **4.9.2 Anionenaustauschchromatographie**

Säulenmaterial: MonoQ HR 5/5

Säulenabmessungen: 0,5 x 5 cm, entspricht einem Säulenvolumen von 1 ml

Puffer A: 10 mM Tris-HCl; 0,1 % TX-100; pH 7.0

Puffer B: 10 mM Tris-HCl; 0,1 % TX-100; pH 7.0; 1 M NaCl

Flußrate: 0,5 ml/min

Die Enzymprobe (ca. 500 µl) wurde mit Puffer A auf 1 ml aufgefüllt und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die mit Puffer A equilibrierte Säule aufgetragen. Nicht gebundenes Protein wurde mit einem Säulenvolumen Puffer A von der Säule gewaschen, gebundenes Protein in einem Gradienten von 0-1 M NaCl von der Säule eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden nochmals mit Inhibitoren versetzt und sofort weiterverarbeitet oder bis 24 Stunden bei 4 °C gelagert.

### **4.9.3 Gelfiltrationschromatographie**

Säulenmaterial: Superdex 200 HR 10/30

Säulenparameter: 1,0 x 31 cm, Füllmenge 24 ml

Puffer A: 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 6,8 -7,0, 150 mM NaCl

Flußrate: 0,5 ml/min

Die Säule wurde mit Puffer A equilibriert. Nach dem Solubilisieren mit Extraktionspuffer wurde die Enzymprobe einem Detergenzwechsel durch Ultrazentrifugation mit Centricons mit Puffer A unterzogen, TX-100 wurde durch Octylpyranosid ersetzt. Danach wurde die Probe in einem Volumen von 50 µl aufgetragen. Die Auftragsgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Es erfolgte sofort ein Aktivitätstest.

#### **4.10 Inhibitorstudien**

Um die Enzymaktivität der Acetyltransferase weiter aufzuklären, wurden Versuche zur Hemmung und zum Schutz des Enzyms durchgeführt. DEPC und NBS sollten das Enzym fast vollständig hemmen und Acetyl-CoA sollte das Enzym vor Hemmung schützen (Bame & Rome 1986). Dies sollte dann im Assay überprüft und anschließend in der zweidimensionalen Gelelektrophorese visualisiert werden.

##### **4.10.1 Diethylpyrocarbonat (DEPC)**

Diethylpyrocarbonat wurde mit kaltem Ethanol (z.A.) zu einer 1 M Lösung verdünnt. Diese Stammlösung wurde bei 4 °C maximal 4 Wochen aufbewahrt. Alle weiteren Verdünnungen wurden vor jedem Versuch frisch angesetzt und höchstens 24 h verwendet. Die DEPC-Stammlösung wurde mit 10 mM MES-Puffer pH 7,0 verdünnt und es wurden 5, 15, 50 und 100 mM Lösungen verwendet, um die Hemmung des Enzyms bei verschiedenen Molaritäten zu überprüfen. Standardmäßig wurde das DEPC später in einer Endkonzentration von 7 mM eingesetzt. Die Enzymproben wurden 15 min bei RT mit DEPC inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Imidazol in einer Endkonzentration von 25 mM gestoppt. Die Proben wurden nach 2-minütiger Inkubation bei RT direkt im Enzymassay eingesetzt oder in dem 2D-Solubilisierungspuffer aufgenommen und für die zweidimensionale Gelelektrophorese weiterverarbeitet.

#### 4.10.2 N-Bromosuccinimid (NBS)

N-Bromosuccinimid wurde in Aceton gelöst und mit destilliertem Wasser verdünnt. Maximal 2 % Aceton sollten im Reaktionsansatz vorhanden sein, um die Enzymaktivität nicht zu beeinflussen. NBS wurden in Endkonzentrationen von 0,5 und 1 mM eingesetzt. Die Proben wurden 15 min bei RT inkubiert und sofort im AT-Assay eingesetzt.

#### 4.10.3 Vorbehandlung mit Acetyl-CoA

Die Enzymproben wurden mit Acetyl-CoA zu einer Endkonzentration von 15 mM versetzt, mit der Pipette gut vermischt und nach 2 min Inkubation bei RT wurde dann das DEPC zugegeben und wie unter 4.9.1 weiterverfahren.

#### 4.10.4 Vorbehandlung mit Glucosamin

Die Enzymproben wurden mit Glucosamin zu einer Endkonzentration von 4 mM versetzt, mit der Pipette gut vermischt und nach 2 min Inkubation bei RT wurde dann das DEPC zugegeben und wie unter 4.9.1 weiterverfahren.

### 4.11 *Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch Free-Flow-Elektrophorese*

#### 4.11.1 Das Octopus-Gerät

Vor Inbetriebnahme des Gerätes wurde die Thermostatisierplatte der Trennkammer mittels eines Kühlgerätes ca. 1 h auf 4 °C vorgekühlt. Dann wurde die Trennkammer verschlossen und mit entgastem Millipore-Wasser langsam luftblasenfrei aufgefüllt und gespült. Alle Puffer sollten ebenfalls mit entgastem Millipore-Wasser angesetzt werden. Die Trennkammer sollte jedoch von Anfang an absolut luftblasenfrei sein, um Laufvarianzen ausschließen zu können. Befüllt wird die Trennkammer in vertikaler Position, der Lauf erfolgt in horizontaler Lage. Die Elektrodenkammern sollten zuerst mit Puffer befüllt werden, da hierbei sonst erneut Luftbläschen in die Trennkammer gelangen könnten. Beim Spülen des Gerätes sollte darauf geachtet werden, daß alle 96-Fraktionierschläuche durchgängig sind und evtl. mit einer

Spritze durchgespült werden müssen. Mit Wasser ist nur bei hohem Flow eine gleichmäßige Fraktionierung möglich, deshalb muss meistens mit Additiven gearbeitet werden. Saccharose als Additiv, ist nicht zu empfehlen, da diese sehr schnell und sehr nachhaltig die Kapillarschläuche verstopft und keine Fraktionierung mehr möglich ist. Gute Erfolge konnten mit dem Zusatz von 2 % HPMC (w/v) erzielt werden. Dies ermöglichte zumindest im wichtigen mittleren Bereich eine gleichmäßige Fraktionierung und störte nicht beim Aktivitätstest. Problematisch ist es jedoch wenn man mit den aktiven Proben weiter arbeiten will, denn das viskose HPMC stört jede Säulenchromatographie mittels FPLC oder HPLC und muß vorher entfernt werden.

Das Octopus-Gerät war wie folgt ausgestattet:

Trennkammer: Außendimensionen: 640×180×80 mm

Trennraumdimensionen: 500×100×0,4 mm

Spacer: 0,4 mm Dicke mit gezackten Seitenrändern

Kamm: 96-Fraktionier-Kapillarschläuche

Medienpumpe:

- 1 Schlauch für Trennmedium
- 2 Schläuche für Stabilisierungsmedien
- 1 oder 2 Schläuche für Gegenstrom
- 1 Schlauch für die Probe

Spannungsgerät: bis 2000 V einstellbar

#### **4.11.2 Testexperiment für die Free-Flow isoelektrische Fokussierung**

Es wurde ein Gemisch aus Bromphenolblau, Methylrot, Rinderserumalbumin und Methylenblau für den Probelauf verwendet. Die fokussierten Banden von Methylrot und angefärbtem Rinderserumalbumin zeigten die Bildung des pH-Gradienten und ermöglichen eine Beurteilung des Strömungsprofils im Trennraum. Zur Beurteilung des Laufes reichte in den meisten Fällen die visuelle Kontrolle und es konnten so die Parameter für einen Lauf ermittelt werden.

#### **4.11.3 Kontinuierliche Free-Flow isoelektrische Fokussierung im linearen pH-Gradienten**

Das Verfahren der kontinuierlichen Free-Flow isoelektrischen Fokussierung wird in einem "freien" Elektrolyten durchgeführt, d.h. es handelt sich hier um eine Hochspannungselektrophorese ohne Trägermaterial wie Agarose oder Polyacrylamid. Es wurde für unsere Fragestellung eine Trennung im linearen pH-Gradienten mit Hilfe von Ampholyten ausgewählt. Die isoelektrische Fokussierung wird immer mit Randstabilisierung durchgeführt.

##### Trennung im linearen pH-Gradienten mit Hilfe von Ampholyten:

In diesem Verfahren werden gleichzeitig 3 Medien über separate Einlässe zugeführt.

Die Zusammensetzung der Medien ist wie folgt:

Trennmedium: 0,5 % Ampholyte (v/v)

anodales Stabilisierungsmedium: 100 mmol Phosphorsäure + Additive

kathodales Stabilisierungsmedium: 50 mmol Natronlauge + Additive

Unter dem Einfluß des elektrischen Feldes bildet sich beim Durchlauf der Ampholyte durch die Trennkammer ein linearer pH-Gradient bereits im unteren Teil der Trennkammer aus. Die Probe, die gleichzeitig über eine separate Dosierstelle aufgegeben wird, wird nachfolgend gemäß den unterschiedlichen pI-Werten der Einzelsubstanzen in dem entstehenden pH-Gradienten aufgetrennt. Die wichtigste Vorbedingung für gute Trennergebnisse der Apparatur sind möglichst ähnliche oder identische Werte der Dichte und der Viskosität aller Medien und der Probe.

#### **4.11.4 Ermittlung des isoelektrischen Punktes der Acetyltransferase**

Nachdem alle Vorbereitungen und Vorversuche, wie unter 10.1-10.3 beschrieben, durchgeführt worden waren, erfolgte der Octopus-Lauf nach folgendem Protokoll:

Es wurden folgende Puffer verwendet:

Extraktionspuffer:

3 % TritonX-100 (w/v), 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,0

Elektrodenpuffer:

anodal 100 mM Phosphorsäure

kathodal 100 mM NaOH

Stabilisierungsmedien:

anodal:

100 mM Phosphorsäure, 30 mM Glutaminsäure, 30 mM Asparaginsäure, 0,2 % HPMC (w/v), 0,5 % Triton X-100 (w/v)

kathodal:

100 mM NaOH, 1 % Ethanolamin (w/v), 20 mM Arginin, 0,2 % HPMC (w/v), 0,5 % Triton X-100 (w/v)

Counterflow-Medium:

0,2 % HPMC (w/v), 0,5 % Triton X100 (w/v)

Trennmedium:

0.2 % HPMC (w/v), 0.5 % Triton X-100 (w/v), 0.5 % Ampholyte (Servalyte pH 3-7)

Probenvorbereitung:

80 µl durch Ultrazentrifugation gereinigte Membranen wurden mit 320 µl Extraktionspuffer 30 min bei 4 °C langsam rotierend solubilisiert und dann bei 14 000 rpm in der Eppendorff-zentrifuge abzentrifugiert. Zu dem Überstand wurden 800 µl H<sub>2</sub>O gegeben, um die Tritonkonzentration beim Auftrag der Probe auf 1 % herabzusetzen. Die Probe sollte nicht im sauren Bereich aufgetragen werden und wurde somit mit dem rechten Zulauf aufgetragen. Um das Laufverhalten verfolgen zu können, wurde die Probe mit Bromphenol versetzt.

Beim OCTOPUS wurden folgende Parameter eingestellt:

Probenauftrag bei 'Flow' 95, Dauer ca. 20 min

Counterflow: 1 Schlauch, 'Flow' 10

Fraktionieren: Beginn nach 30 min, Dauer ca. 25 min; Fraktioniergefäße vorgekühlt

Spannung: 1 300 V , beim Start 20 W, 16 mA; nach 5 min 15 mA, nach 30 min 12 mA

Nach dem Lauf wurden die Fraktionen sofort einem Acetyltransferase-Aktivitätstest unterzogen und dann bei 4 °C aufbewahrt. Es wurden weiterhin der pH-Gradient, die  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität und der Proteingehalt bestimmt.

#### 4.12 Herstellung der Affinitätsperlen

Der monoklonale Antikörper 2D5 gegen h LAMP 2 wurde bereits früher charakterisiert (Radons *et al.*, 1990). Es wurden 0,6 mg von 2D5 an 200 mg Eupergit-C1Z gekoppelt (Grässel *et al.*, 1988). Die Lagerung mußte bei -80 °C stattfinden, um einen Aktivitätsverlust zu verhindern.

#### 4.13 Zweidimensionale Elektrophorese

##### Lösungen:

Solubilisierungslösung:	9 M	Harnstoff
	0,55 % (w/v)	TX-100
DTT-Stammlösung:	1 M	Dithiothreitol
CHAPS-Stammlösung:	20 % (w/v)	CHAPS
Ampholyte	2 % (w/v)	SDS
	0,25 % (w/v)	Dithiothreitol
	50 mM	Tris/HCl pH 6,8
Equilibrierungslösung 1:	30 % (v/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	0,25 % (w/v)	Dithiothreitol
	50 mM	Tris/HCl pH 6,8



Equilibrierungslösung 2:	30 % (v/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	25 mM	Jodacetamid
	6 M	Harnstoff
	50 mM	Tris/HCl pH 6,8
Anodenpuffer:	23 mM	Tris/Glycin pH 8,8
Kathodenpuffer:	23 mM	Tris/Glycin pH 8,8
	0,1 % (w/v)	SDS
	1 ppm (w/v)	Bromphenolblau

Die zweidimensionale Auftrennung von Proteinen basierte mit einigen Veränderungen auf dem Immobiline-System von Pharmacia-Biotech: Die verwendeten getrockneten Immobiline-Fokussierungstreifen mit verschiedenen pH-Gradienten (3-10; 4-7; 5-6) haben im gequollenen Zustand Abmessungen von 110×3×0,5 mm<sup>3</sup>.

#### 4.13.1 Probenvorbereitung

Das aufzutrennende Proteingemisch sollte weniger als 15 µl Volumen und eine minimale Salzkonzentration (bis 150 mM) haben. Das Eluat der Ionenaustauschchromatographie wurde durch Ultrafiltration (Centripreps) auf ein Volumen  $\leq 100$  µl ankonzentriert und zum Umpuffern und Entsalzen zweimal mit 1 ml entsprechendem Puffer gewaschen. Die Solubilisierungslösung wurde in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert. Zur Deionisierung wurden ca. 100 mg AG 501X8 Mischbettionenaustauscher zugegeben und 30 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Der Überstand wurde jetzt mit einer 20 %igen (w/v) CHAPS-Lösung auf 0,55 % (w/v) gebracht und mit weiteren 1 % (w/v) Ampholyten (pH 3,5 - 10; 40 % (w/v)) versetzt. Die zu trennende Probe (z.B. ein C1Z-Pellet, lyophilisiertes Material, ankonzentrierte Proteinprobe oder ein Aceton-Pellet) wurde mit dieser Harnstofflösung auf 150 µl aufgefüllt, sofort kräftig suspendiert und, zur vollständigen Lösung sämtlicher Proteine, 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Bei radioaktiven C1Z-Proben verblieben ca. 10 - 20 % der Radioaktivität im Pellet.

Wenn die Ablösung der Antikörper von den C1Z-Perlen verhindert werden sollte, wurde DTT erst jetzt auf 10 mM eingestellt (mit 1 M Stammlösung) und nochmals 5 min bei 37 °C inkubiert.

Die Probe wurde nun in die mit Fett abgedichtete Quellkammer überführt. Eine dünne Spur mit 2 % TX-100 (w/v) am rechten Rand der Quellkammer verhinderte beim Zugeben der Probe eine Benetzung über die Breite des Schlitzes und ein Stoppen des Einfließens.

Möglichst bald wurde nun ein Fokussierungsstreifen in die Quellkammer eingeführt. Der Schlitz mit dem Streifen wurde mit der deionisierten und ergänzten Harnstofflösung aufgefüllt und mit Paraffin überschichtet. Die Quellung erfolgte über 24 Stunden.

#### **4.13.2 Aufbau der Fokussierungskammer**

Die Streifen wurden aus der Quellkammer genommen und zügig in die mit Paraffin gefüllte PVC-Fokussierungswanne gelegt, die auf 10 °C thermostatisiert wurde. Der Streifen enthielt jetzt ca. 80-90 % des zugegebenen Proteins. Die Elektrodenstreifen (ca. 5 mm breite Filterpapierstreifen) wurden gemäß der Anzahl der Immobilin-Streifen in der richtigen Länge zugeschnitten. Sie wurden mit Aqua bidest. getränkt und dann auf ein Stück Zellstoff gelegt. Nach ca. 3 sec hatte sich die Hauptmenge des überschüssigen Wassers in den Zellstoff gesogen. Die Elektrodenstreifen wurden jetzt zweimal zwischen zwei Lagen Zellstoff gelegt und ganz leicht, von oben mit dem Finger angedrückt. Die Streifen wurden unter Paraffin auf die Enden der Gelstreifen gelegt. Dann wurde die Vorrichtung mit den Platinelektroden aufgelegt und leicht beschwert.

#### **4.13.3 Die Fokussierung**

Der Spannungsverlauf war folgendermaßen:

2 Stunden	300 Volt
2 Stunden	1 000 Volt
8 Stunden	3 000 Volt

#### 4.13.4 Equilibrierung

Nach Entnahme der Streifen aus der Paraffin-gefüllten Fokussierungswanne wurden die Gelstreifen einer 15 minütigen Inkubation in 20 ml Equilibrierungslösung I bei RT auf dem Kipptisch unterzogen. Dann wurden die Streifen für 90 sec in eine 95 °C heiße Equilibrierungslösung I gehalten. Anschließend kamen die Streifen wieder bei RT für 15 min auf den Kipptisch in Equilibrierungslösung II.

Bei diesen drei Schritten gehen weitere 10 - 15 % der in die Quellschleife eingeführten Proteinmenge verloren. Die Streifen wurden jetzt für ca. 1 min aufrecht auf ein Stück saugfähiges Papier gestellt um einen Großteil der anhängenden Lösung herablaufen zu lassen.

#### 4.13.5 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese der fokussierten Proteine erfolgte zwischen zwei vertikal angeordneten Glasplatten in 5 Liter des Anodenpuffers. Die Gellänge betrug 1 mm, die Länge 10 cm und die Breite 14 cm. Das Trenngel wurde am Vortag gegossen. Für zwei 2D-Gele mit 14,1 % Gesamt-Acrylamidkonzentration wurden zusammenpipettiert:

14 ml	30 % (w/v) Acrylamid
4 ml	1 % (w/v) Bisacrylamid
7,5 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
4,1 ml	H <sub>2</sub> O bidest.
0,3 ml	10 % (w/v) SDS
25 µl	TEMED
100 µl	25 % (w/v) Ammoniumpersulfat

Das Gel wurde dabei bis 4 cm unter die Oberkante der vorderen Glasplatte gegossen. Es wurde mit einem Gemisch aus Trenngelpuffer : Wasser : Isopropanol ( 1 : 1 : 2 ) überschichtet, bis das Acrylamid polymerisiert war. Für die Lagerung bei 4 °C über Nacht wurde auf das Gel folgende Lösung gegeben: Trenngelpuffer : Wasser ( 1 : 3 ) mit 0,3 % (w/v) SDS.

Für eine oder zwei Taschen zur parallelen eindimensionalen Trennung einer Proteinprobe wurde vorher seitlich ein Sammelgel gegossen. Für 4 Sammelgele (Bedarf: 1 ml) wurden zusammenpipettiert:

160 µl	30 % (w/v) Acrylamid
110 µl	1 % (w/v) Bisacrylamid
250 µl	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
470 µl	H <sub>2</sub> O bidest.
0,3 ml	10 % (w/v) SDS
1 µl	TEMED
4 µl	25 % (w/v) Ammoniumpersulfat

Für eine Sammelgeltasche wurde wie folgt vorgegangen:

Ungefähr 1,5 cm vom Rand wurde ein 1 mm dicker Platzhalter bis auf das Trenngel zwischen die Glasplatten geschoben und der Übersichtungspuffer in der kleineren Abteilung abgesaugt. Anschließend wurde ein kleinerer Platzhalter (ein- oder zweizähniger Kamm) in diese Abteilung eingeklemmt, welcher bis dicht über das Trenngel reichte. Dann wurde etwa 1 cm hoch Sammelgel um die Aussparung durch den Platzhalter gegossen, das Gel lief später um so gerader, je niedriger das Sammelgel war. Das Probenvolumen mußte dafür entsprechend reduziert werden. Nach dem Polymerisieren wurden die Platzhalter entfernt und die verbleibende Flüssigkeit abgesaugt. Der Kathodenpuffer wurde in die obere Kammer gefüllt. Der abgetropfte Fokussierungs-Streifen wurde dann direkt unter den Puffer auf das Trenngel gelegt und leicht angedrückt. Die Probe für die eindimensionale Trennung wurde ebenfalls aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 5 Litern des unteren Elektrodenpuffers bei RT. Die erste Stunde wurde der Strom auf 10 mA pro Gel justiert, danach auf 15 mA bis die Bromphenolblau-Front das untere Gel-Ende erreicht hatte.

#### 4.14 Färbung der Gele mit Silbernitrat

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in ca. 50 ml der folgenden Lösungen bei RT geschwenkt:

<b>Schritt:</b>	<b>Dauer:</b>	<b>Lösung:</b>
Fixierung	>30 min	40 % (v/v) Ethanol 10 % Essigsäure (w/v)
Vernetzung	Über Nacht	30 % Ethanol 0,5 M Na-Acetat 0,2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,13 % (w/v) Glutardialdehyd
Waschen	3 × 10 min	$\text{H}_2\text{O}$ dest.
Silberbehandlung	>30 min	0,2 % (w/v) $\text{AgNO}_3$ 0,02 % (v/v) Formaldehyd
Waschen	2 min	$\text{H}_2\text{O}$ dest.
Entwicklung	ca. 10 min	2,5 % (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,02 % (v/v) Formaldehyd
Abstoppen	1 min	5 % (v/v) Essigsäure
Waschen	3 × 10 min	$\text{H}_2\text{O}$ dest.
Trocknen	zwischen Zellophanfolie	

Diese Färbung zeigte im Vergleich zu einer Färbung ohne Vernetzungsschritt einen weniger exponentiellen Schwärzungsverlauf und ermöglichte dadurch bei gleicher Intensität der prominentesten Proteine auch die Visualisierung von sehr schwach vertretenen Proteinen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung von dichten Lysosomen aus humaner Placenta

Dichte Lysosomen wurden, wie unter 4.1 ausgeführt, aus humaner Placenta gewonnen. Die Anreicherung des lysosomalen Markerenzym  $\beta$ -Hexosaminidase einer Lysosomen-Präparation ist in Tabelle 2 dargestellt. Der Anreicherungsfaktor betrug ca. 50-60, wobei diese Werte je nach Placenta stark variierten. Die Fraktionen zwei bis fünf wiesen die höchste spezifische Aktivität des Markerenzym  $\beta$ -Hexosaminidase auf und stellten den sogenannten "dichten Pool" dar.

*Tabelle 2: Reinigung von dichten Lysosomen aus humaner Placenta*

	Protein		$\beta$ -Hexosaminidase		
	Gesamt	Ausbeute	Ausbeute	Spezifische Aktivität	Reinigungs-Faktor
Fraktion:	(mg)	(%)	(%)	(Units/mg)	
Homogenat	9 655	100,00	100	0,07	1,0
Post-nukleärer Überstand	5 310	55,00	46	0,07	1,0
Organellen-Konzentrat	795	8,20	32	0,30	4,2
Dichte Lysosomen	27	0,27	10	3,90	55,0

#### 5.1.1 Affinitätsreinigung lysosomaler Membranen aus dem "dichten Pool"

Für die Membranreinigung wurde der "dichte Pool" mit Proteinase-Inhibitoren versetzt und wie unter 4.2 beschrieben, mit Ultraschall behandelt. Für die Affinitätsreinigung im Batchverfahren wurden an Perlen gekoppelte Antikörper eingesetzt und direkt mit dem "dichten Pool" inkubiert. Die Perlen wurden, wie unter 4.4 beschrieben, abzentrifugiert und gewaschen.

## **5.2 Markierung eines Acetyl-CoA bindenden Proteins in der lysosomalen Membran**

### **5.2.1 Die Strategie**

Die Acetyl CoA:α-Glucosamin N-Acetyltransferase ist ein Enzym, das in Gegenwart von Acetyl-CoA α-Glucosamin-Reste acetyliert. Bei dieser Acetyltransferase handelt es sich wahrscheinlich um ein integrales Membran-Protein. Bame & Rome hatten schon 1986 versucht, durch kinetische Studien an lysosomalen Membranen aus Rattenleber sowie durch radioaktiven Markierungsversuche, den Enzymmechanismus aufzuklären. Studien mit intakten Lysosomen zeigten, daß exogene Zuführung von Acetyl-CoA zur Acetylierung von luminalen Glycosaminoglykanen führte. Es wurde von Bame & Rome die Entstehung eines acetylierten Enzym-Intermediates postuliert.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden zunächst Versuche zur Markierbarkeit des Enzyms durchgeführt. Hierzu wurden durch Affinitätsreinigung gewonnene, lysosomale Membranen mit tritiummarkiertem Acetyl-CoA inkubiert. Zur Bestimmung der Molmasse von eventuell markierten Proteinen wurden diese in einem SDS-Gel aufgetrennt. Weiterhin wurden Versuche mit Acetyl-CoA und verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt, um die Theorie eines acetylierten Intermediats eventuell bestätigen zu können.

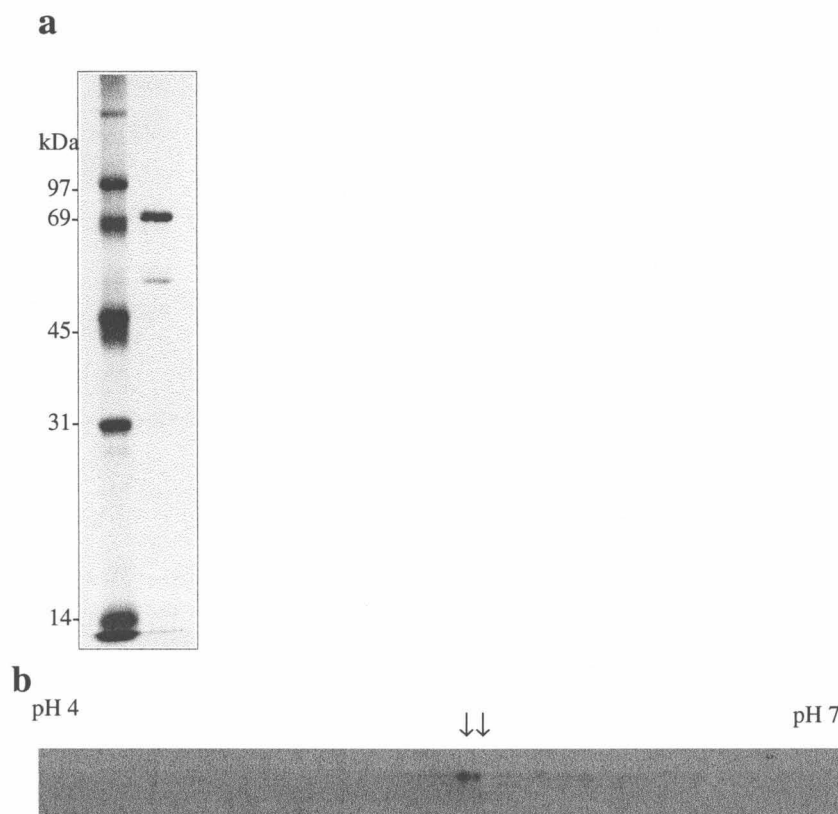
### **5.2.2 Die Markierung**

Mittels Immunoaffinität gereinigte lysosomale Membranen wurden, wie unter 3.5.5 beschrieben, mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA inkubiert und dann im SDS-Gel aufgetrennt. Die Autoradiographie zeigte zwei deutlich markierte Proteine unterschiedlicher Intensität. Ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa war sehr stark markiert, außerdem noch ein zweites Protein mit einer sehr schwachen, aber ebenfalls sehr deutlichen Bande in der Größe von ca. 53 kDa (siehe Abbildung 3a).

Durch isoelektrische Fokussierung in einem Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten konnten die isoelektrischen Punkte der markierten Proteine ermittelt werden. Die Probenvorbereitung und Fokussierung erfolgte, wie unter 3.5.6 beschrieben.

Die isoelektrischen Punkte der beiden Proteine konnten direkt aus der Position der Proteinbanden im Immobiline-Gelstreifen (pH 4-7) bestimmt werden. Sie lagen dicht nebeneinander im pH-Bereich von 5,4 bis 5,6 (siehe Abbildung 3b).

Trotz sehr schwacher Markierung waren aber eindeutig auch hier zwei Proteine unterschiedlicher Intensität erkennbar. Der Verlust durch die Fokussierung war jedoch so groß, daß für eine Auftrennung in der zweiten Dimension, die weitere Verluste mit sich bringt, die radioaktive Markierung nicht ausreichte. Daraufhin wurde versucht ein Tritium-markiertes Acetyl-CoA mit einer spezifischen Aktivität von über 30 mCi/mmol (bisher maximal 15 mCi/mmol) zu erwerben, um eine zweidimensionale Auftrennung der bisher markierten Proteine zu ermöglichen.



**Abbildung 3: Radioaktive Markierung**

von 2 Proteinen mit 100  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA (15 Ci/mmol) in lysosomalen Membranen aus humaner Placenta. Schwere Lysosomen wurden aufgebrochen und die Membranen durch Immunoaffinitäts-Reinigung präpariert. Es wurden ca. 10  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt und nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 30 °C a) in einem SDS-Gel und b) in der isoelektrischen Fokussierung im pH-Bereich 4-7 durch Fluorographie sichtbar gemacht.



### 5.2.3 Zeitabhängigkeitsversuche zur Markierung

Da zwei Proteine in den lysosomalen Membranen mit 100  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA (15 Ci/mmol) markiert werden konnten, wurden nun Untersuchungen bezüglich der Art der Markierung durchgeführt. Durch verschiedene Inkubationszeiten bei 30 °C sollten der Markierungsmechanismus sowie Dauer und Stabilität der Markierung untersucht werden. Das markierte Protein mit dem höheren Molekulargewicht zeigte bei diesen zeitabhängigen Markierungsversuchen, daß die Markierung bereits ohne zusätzliche Inkubation bei 30 °C erfolgte, das Maximum etwa bei 2,5 Sekunden erreicht war und bis zur 5. Minute wieder stark abnahm (siehe Abbildung 4 und 5).

Die Markierung des 75 kDa-Polypeptids erfolgte vorübergehend. Nach einer Inkubationsdauer von 15 bis 45 Minuten wurden andere Polypeptide markiert.

Das schwächer markierte Protein mit dem geringeren Molekulargewicht zeigte keine spezifischen Veränderungen durch unterschiedliche Inkubationszeiten. Dies lieferte einen ersten Anhaltspunkt dafür, daß es sich bei dem Protein mit dem Molekulargewicht von 75 kDa um das gesuchte Protein handeln könnte. Die Zeitabhängigkeit der Inkubation zur Markierung ließ auf eine enzymatische Reaktion schliessen.

In der Literatur (Garbutt & Abraham 1981) gibt es Anhaltspunkte dafür, dass mit Acetyl-CoA verschiedene Proteine nicht enzymatisch markiert werden können. Ein weiterer Hinweis auf eine nicht-enzymatische Acetylierung wurde in dieser Arbeit erhalten (siehe Abbildung 10a).

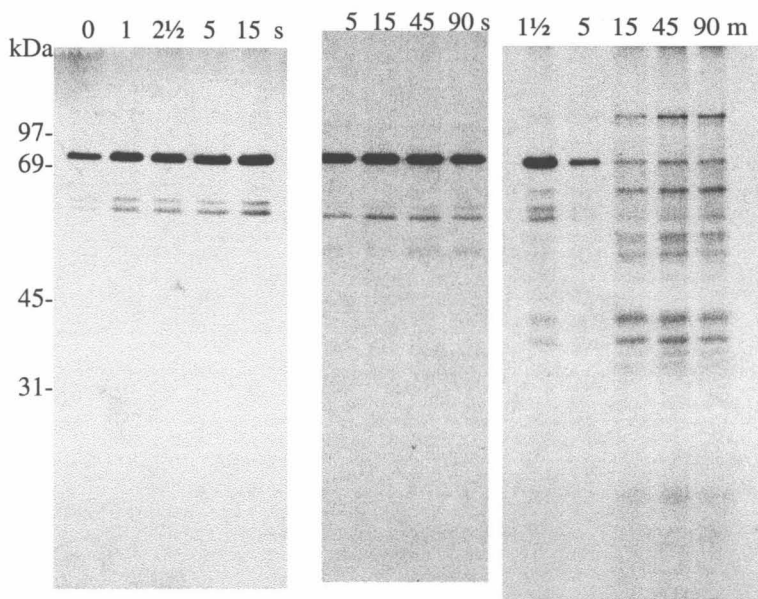


Abbildung 4: Zeitabhängigkeit der Markierung mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA in durch Immunoaffinität gereinigten lysosomalen Membranen. Es wurden  $10\ \mu\text{g}$  Protein eingesetzt und in einem SDS-Gel durch Fluorographie sichtbar gemacht.

Die Inkubationszeiten sind jeweils obenstehend angegeben (0-90 Sekunden und  $1\frac{1}{2}$ -90 Minuten).

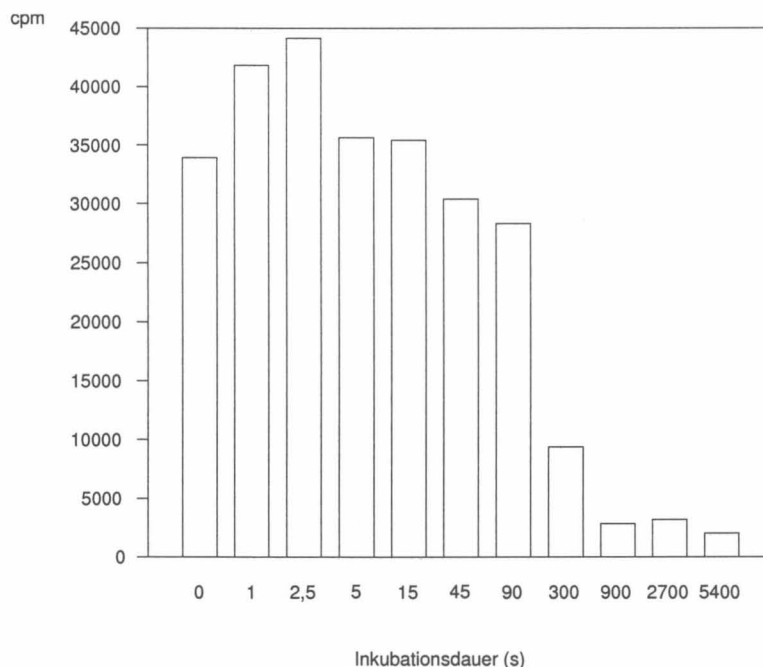


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Intensität der Schwärzung der mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA markierten Banden (siehe Abbildung 4), die Auswertung erfolgte mit einem Phosphor-Imager. Die Markierung erfolgte bei einer Inkubationszeit von 1 sec bis 5 min.

#### 5.2.4 Markierung des Proteins in Fibroblasten mit und ohne genetischem Defekt

Zur weiteren Aufklärung der Identität der markierten Proteine wurde versucht, diese in lysosomalen Membranen aus humanen Fibroblasten mit und ohne genetischem Defekt zu markieren. Es wurde eine große konfluente Zellkulturflasche geerntet und die lysosomalen Membranen durch die Immunoaffinitäts-Methode präpariert. Das stark markierte Protein mit einem Molekulargewicht von 75 kDa konnte in allen Zellen markiert werden, ohne Unterschied zwischen Kontroll- und Patientenzellen mit dem Sanfilippo C-Syndrom. Das 53 kDa-Protein wurde ebenfalls in allen Zelllinien detektiert. Zusätzlich wurde in beiden Zelllinien noch eine ganze Serie von anderen Proteinen in ähnlicher Intensität markiert. Auf weitere Versuche mit Fibroblasten wurde deshalb nachfolgend verzichtet.

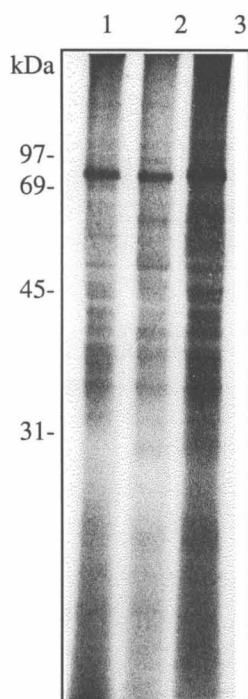


Abbildung 6: Radioaktive Markierung von lysosomalen Membranen mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA aus verschiedenen humanen Fibroblasten 1) ohne SFC-Syndrom 2+3) von Patienten mit dem SFC-Syndrom. Die lysosomalen Membranen wurden durch Immunoaffinitäts-Reinigung präpariert. Es wurde jeweils eine große konfluente Zellkulturflasche verwendet. Die Proben wurden 5 Minuten bei 30 °C mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA inkubiert und in einem SDS-Gel durch Fluorographie sichtbar gemacht.

### 5.3 Etablierung eines Assays zur weiteren Identifizierung des Proteins

Die Anreicherung des Enzyms setzt die Etablierung eines geeigneten Assays zur Aktivitätskontrolle voraus. Daher wurde, wie unter 4.13.2 beschrieben, ein Assay für die Acetyltransferase auf der Basis eines Kationenaustauschers mit tritiummarkiertem Glucosamin und Acetyl-CoA entwickelt. Um die Abhängigkeit des Assays von der Enzymmenge zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen an lysosomalen Membranen eingesetzt (siehe Abbildung 7). Dies ermöglichte die Bestimmung eines linearen Bereiches für alle weiteren Versuche. Der Assay wurde mit lysosomalen Membranen aus dem "dichten Pool" humaner Placenta entwickelt und zur Kontrolle mit humanen Fibroblasten ohne Gendefekt und solchen mit dem SFC-Syndrom überprüft. Bei den Fibroblasten mit dem Gendefekt (SFC-Syndrom) sollte keine Acetyltransferase-Aktivität messbar sein, sondern nur bei den Kontrollzellen. Dies konnte nachgewiesen werden (5.4.2), ebenso wie die Hemmung der Acetyltransferase durch Diethylpyrocarbonat, die von Bame & Rome (1986) beschrieben wurde. Der Assay ermöglichte weitere Inhibitorstudien und die Hemmung durch Diethylpyrocarbonat wurde später in der zweidimensionalen Gelelektrophorese dargestellt.

Zuvor waren einige Aktivitätstests im Institut für Physiologische Chemie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Kresse nach der Methode von Kresse *et al.* (1982) in Münster für unseren Arbeitskreis im Rahmen der pränatalen Diagnostik durchgeführt worden. Dieser Test war aber sehr zeitaufwendig und das Substrat nicht kommerziell erhältlich. Nach dem Umzug unseres Instituts von Münster nach Marburg war dies nicht mehr möglich und es wurde notwendig einen eigenen Assay zu etablieren. Da die Acetyltransferase angereichert werden sollte, war es erforderlich einen schnell und oft durchführbaren Assay zu entwickeln, um die Aktivitätsverluste des Enzyms möglichst gering zu halten.

Der jetzt neu entwickelte Assay konnte routinemäßig für die Anreicherung des Enzyms mit einer Anionenaustauschchromatographie (s. 5.5) eingesetzt werden, da er schnell durchführbar war und alle benötigten Substanzen käuflich zu erwerben oder selbst herstellbar waren.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der nativen Acetyltransferase mittels eines Free Flow Elektrophorese Gerätes wurde durch den neuen Assay ebenfalls ermöglicht.

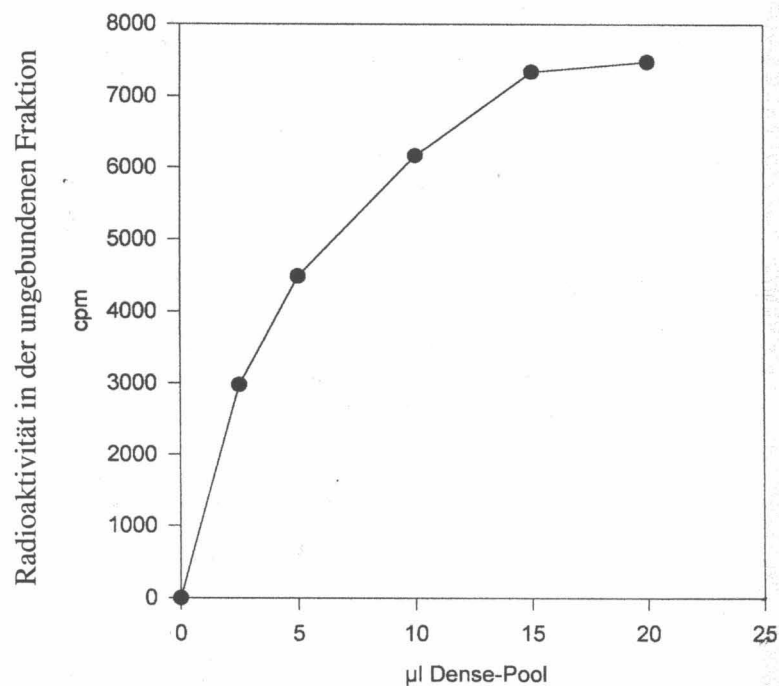


Abbildung 7: Acetylierung von  $^3\text{H}$ -Glucosamin ( $10 \mu\text{Ci}$ ) in Abhängigkeit der Menge des eingesetzten Enzyms des entwickelten Acetyltransferase Assays bei einer Reaktionszeit von 45 Minuten.

Die Radioaktivität des acetylierten Reaktionsproduktes, das an SP-Sephadex C25 nicht bindet, wurde im Szintillationszähler bestimmt.

## 5.4 Versuche zur Hemmung und Spezifität der Acetyltransferase

### 5.4.1 Ermittlung eines Inhibitors

Für die Acetyltransferase wurde schon in früheren Arbeiten eine Hemmung der Aktivität durch N-Bromosuccinimid (NBS) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) nachgewiesen (Bame & Rome, 1986). Die Hemmung durch NBS konnte in lysosomalen Membranen aus humaner Placenta nicht bestätigt werden, jedoch wurde eine deutliche Hemmung der Acetyltransferase durch DEPC beobachtet (siehe Abbildung 8a,b). Alle weiteren Hemmversuche wurden daraufhin mit einer Endkonzentration von 8 mM DEPC im Versuchsansatz durchgeführt.

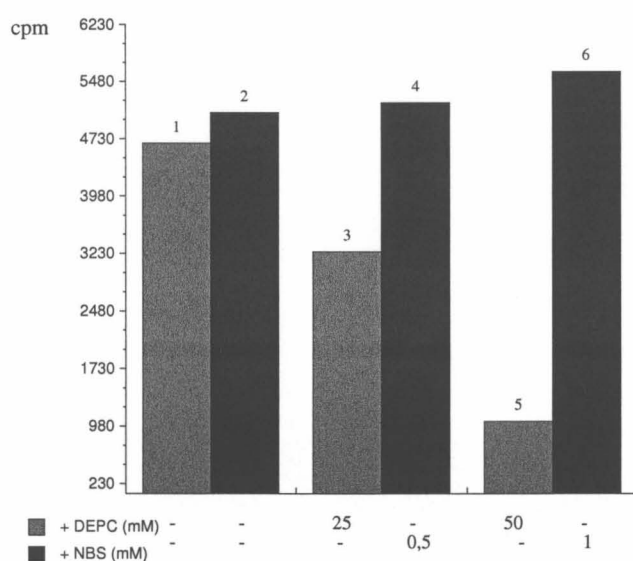


Abbildung 8a: Ermittlung eines Inhibitors und dessen Konzentration zur Hemmung der Acetyltransferase aus dem "dichten Pool" der aus humaner Placenta gewonnen wurde. Es wurden 5 µl von dem "dichten Pool" (Proteinkonzentration ca. 0,5 mg/ml) eingesetzt und standardmäßig 45 min inkubiert.

### 5.4.2 Nachweis der Acetyltransferase in humanen Fibroblasten und Überprüfung der Hemmbarkeit durch DEPC

Zur weiteren Überprüfung der Hemmung durch DEPC wurde der Assay mit Zellhomogenat einer kleinen konfluenten Zellkulturflasche aus humanen Fibroblasten mit dem Sanfilippo-C-Syndrom getestet. Als Kontrolle wurden humane Fibroblasten ohne genetischen Defekt verwendet (siehe Abbildung 8b). Die Enzym-Aktivität wurde nur im Homogenat der Kontroll-Zellen gemessen, so daß man davon ausgehen kann, daß der Assay das gesuchte Enzym detektiert und das intakte Enzym durch DEPC hemmbar ist. Durch Zugabe von Acetyl-CoA konnte kein Schutzeffekt nachgewiesen werden. Bei Zusatz von Glucosamin wurde erwartungsgemäß keine Aktivität gemessen.

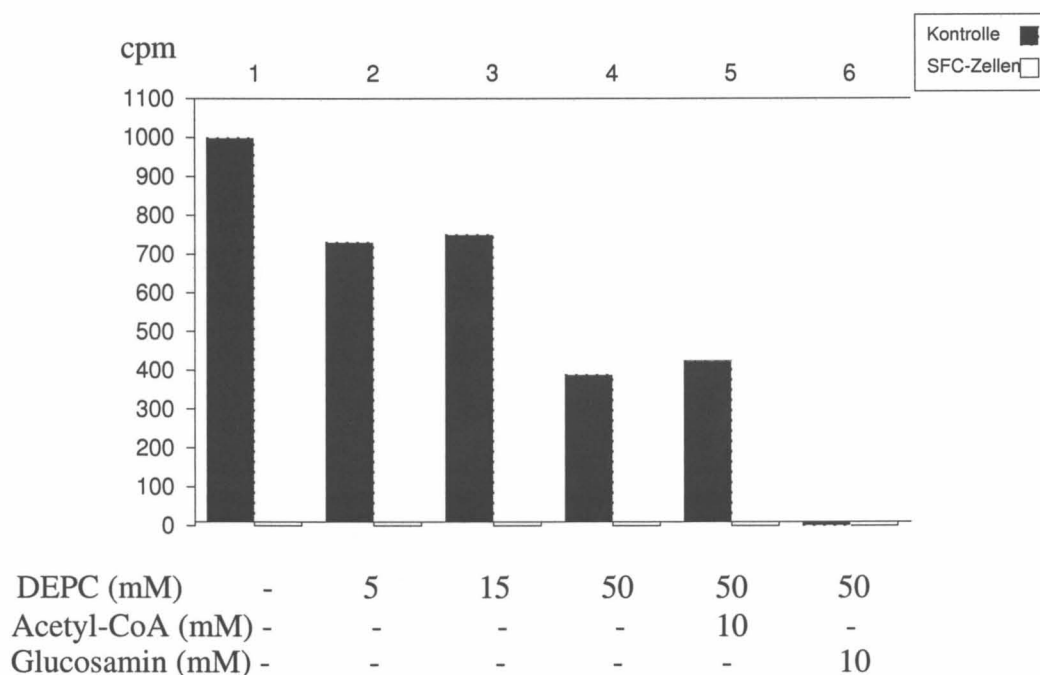


Abbildung 8b: Hemmung der Acetyl CoA:α Glucosamin-N-Acetyltransferase durch DEPC im Zellhomogenat von Kontrollfibroblasten und Nachweis der fehlenden Aktivität bei Fibroblasten mit dem SFC-Syndrom. Es wurde jeweils das Homogenat einer kleinen konfluenten Zellkulturflasche für einen Versuch mit 6 Doppelansätzen verwendet. Die Vorinkubation mit DEPC erfolgte 10 Minuten in Anwesenheit oder Abwesenheit von Acetyl-CoA und wurde mit einer Endkonzentration von 25 mM Imidazol abgestoppt. Die Reaktionszeit des Tests erfolgte standardmäßig 45 Minuten.

## **5.5 Anreicherung der Acetyl-CoA: $\alpha$ -Glucosaminid N-Acetyltransferase (AT)**

### **5.5.1 Enzymsolubilisierung für die Säulenchromatographie**

Aus humaner Placenta gewonnene Lysosomen, wurden durch Immunadsorption die angereicherten Membranen extrahiert. Hieraus sollte nun die Acetyltransferase angereichert werden. Die Enzymaktivität der lysosomalen Membranextraktion ist membrangebunden und kann durch TritonX-100 solubilisiert werden. Die höchste Solubilisierung von ca. 80 % erfolgte bei Zugabe von 3 % TritonX-100 in 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,0 (Extraktionspuffer). Es wurden auch verschiedene alternative Detergenzien wie CHAPS,  $\beta$ -Octylglucopyranosid und Lubrol getestet, die jedoch nur eine Solubilisierung des Enzyms von ca. 20-50 % erbrachten. Für alle weiteren Versuche wurde nur noch TritonX-100 verwendet.

Alle Chromatographien der Acetyltransferase wurden mittels FPLC durchgeführt, um so die Chromatographiezeiten möglichst kurz zu halten, da dies einen entscheidenden Schritt bei der Aufreinigung von empfindlichen Membranproteinen darstellt. Zunächst wurde mit Hilfe der FPLC die Bindung an eine Hydroxyapatitsäule untersucht. Die Acetyltransferase-Aktivität war jedoch ausschließlich im Durchlauf detektierbar.

Der für eine Gelfiltration nötige Detergenzwechsel führte allerdings im Fall von CHAPS und Octylglucopyranosid zu einer deutlich geringeren Solubilisierung und zur deutlich schnelleren Inaktivierung der Acetyltransferase.

### **5.5.2 Anionenaustauschchromatographie**

Die Anionenaustauschchromatographie wurde mit einer MonoQ HR5/5 Säule durchgeführt (siehe 4.7.2). Durch Ultrazentrifugation oder Immunoaffinität angereicherte lysosomale Membranen (150-300  $\mu$ g Protein) wurden solubilisiert und mit Puffer A auf 1 ml aufgefüllt und aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0-1 M NaCl. Dabei wurde das Enzym bei einer Konzentration von etwa 150 mM NaCl von der Säule eluiert, wie aus dem Acetyltransferase-Aktivitäts-Profil in Abbildung 9b deutlich wird.



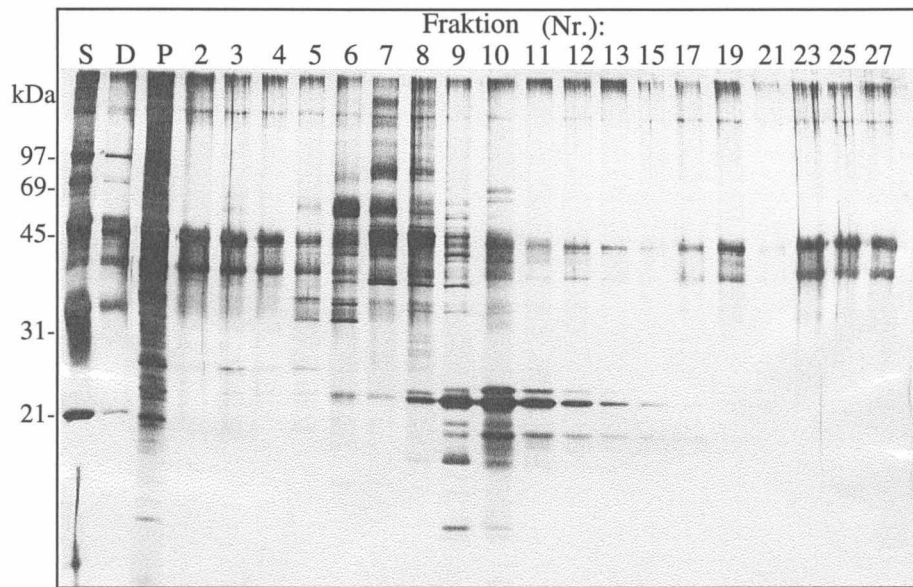


Abbildung 9a: Trennung von 150  $\mu\text{g}$  immunoaffinitäts-gereinigten Membranen mit einer MonoQ HR5/5 Säule. Das Proteinmuster wurde durch SDS-PAGE (je 20  $\mu\text{l}$  der 1 ml Fraktionen) und Silberfärbung bestimmt.

Silbergel der MonoQ-Säulenfraktionen: Molekulargewichts-Standard (S), Durchlauf (D), Probe (P) und Fraktionen 2-13,15,17,19,21,23,25,27

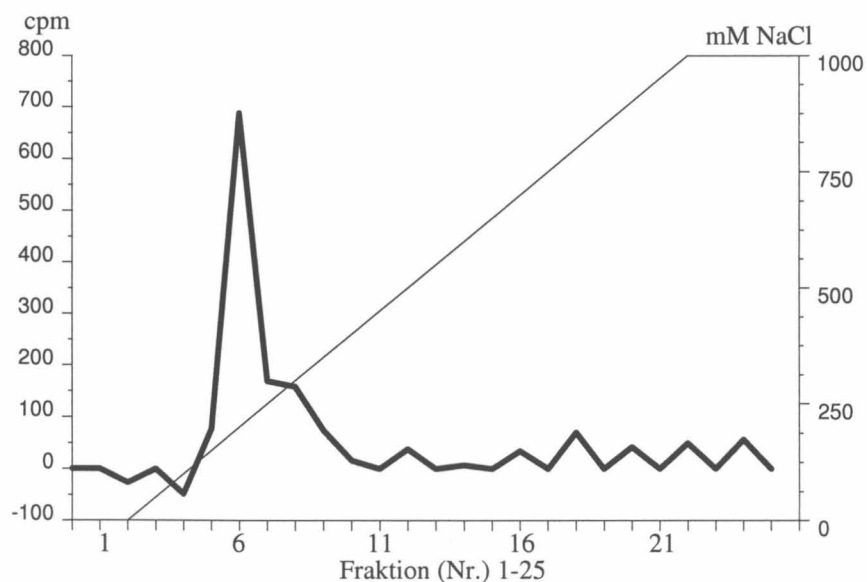


Abbildung 9b: Trennung von immunoaffinitäts-gereinigten Membranen auf einer MonoQ HR5/5 Säule mit einem Gradienten von 0-1 M NaCl. Die Aktivität wurde in 20  $\mu\text{l}$  Aliquots bei einer Inkubationsdauer von 45 min bestimmt.

Die spezifische Aktivität der AT reicherte sich bei diesem Schritt um das 30-fache an (siehe Tabelle 3).

*Tabelle 3: Anreicherung der Acetyltransferase*

Fraktion	Acetyltransferase-Aktivität	
	cpm/ $\mu$ g Protein	Anreicherungsfaktor
Homogenat	1,3	1
Post-nukleärer Überstand	1,4	1
Organellen-Konzentrat	4,0	3
Dichte Lysosomen	109,0	80
Affi-ger. Lysosomen	733,0	535
MonoQ-Fraktion Nr.6	2053,0	1500

Das solubilisierete Enzym verlor nach 24 Stunden die Hälfte seiner Aktivität und war nach 48 Stunden kaum noch aktiv. Deshalb konnten nur Proben nach Immunoaffinitäts- oder Ultrazentrifugations-Reinigung bei -70 °C gelagert werden. Alle weiteren Experimente erfolgten am jeweils gleichen Tag, zusätzlich wurden aktive Fraktionen mit Proteinase-Inhibitoren versetzt.

Das Acetyltransferase-Aktivitäts-Profil war bei durch Ultrazentrifugation und durch Immunoaffinität gereinigten Membranen gleich. So wurden nur noch die durch das letztere Verfahren höher gereinigten Membranen für weitere Versuche verwendet.

## 5.6 Überprüfung der Spezifität der radioaktiven Markierung

Die Markierung der angereicherten Enzymprobe mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA erwies sich als problematisch, da das Enzym solubilisiert und nicht mehr an den Antikörper und somit an die C1Z-Perlen gekoppelt war (siehe Abbildung 10a). Die solubilisierte Enzymprobe musste durch Ultrafiltration eingeeengt werden, so daß nach der Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA aus der Probe die nichtgebundene Radioaktivität mit Hilfe einer Methanol-Chlorform-Fällung herausgewaschen werden konnte. Die Fällung führte zu großen Aktivitätsverlusten (Ausbeuten unter 20 %) und deshalb wurde zusätzlich die fünffache Menge der angereicherten Enzymfraktion eingesetzt. Es konnte trotz der Methanol-Chloroform-Fällung eine schwache Markierung beobachtet werden, die bei Einsatz von 50  $\mu\text{g}$  statt 10  $\mu\text{g}$  Enzymfraktion deutlich stärker war.

Um die Spezifität der Markierung zu prüfen, wurden zusätzlich humanes Serumalbumin und Lysozym ohne lysosomale Membranen mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA inkubiert. Nach der Autoradiographie zeigte sich, daß beide zugesetzten Proteine sehr stark markiert waren.

Die auffällig starke Markierung des Albumins und des Lysozyms ist wahrscheinlich auf die hohe Menge Ausgangsmaterial (100  $\mu\text{g}$ ) zurückzuführen, in dem diese Proteine im Ansatz vorlagen. Das gesamte Protein der angereicherten Enzymprobe in dem Membranextrakt entsprach 10  $\mu\text{g}$ , daher war jedes einzelne Polypeptid um drei oder mehr Größenordnungen weniger vertreten als das Albumin bzw. Lysozym.

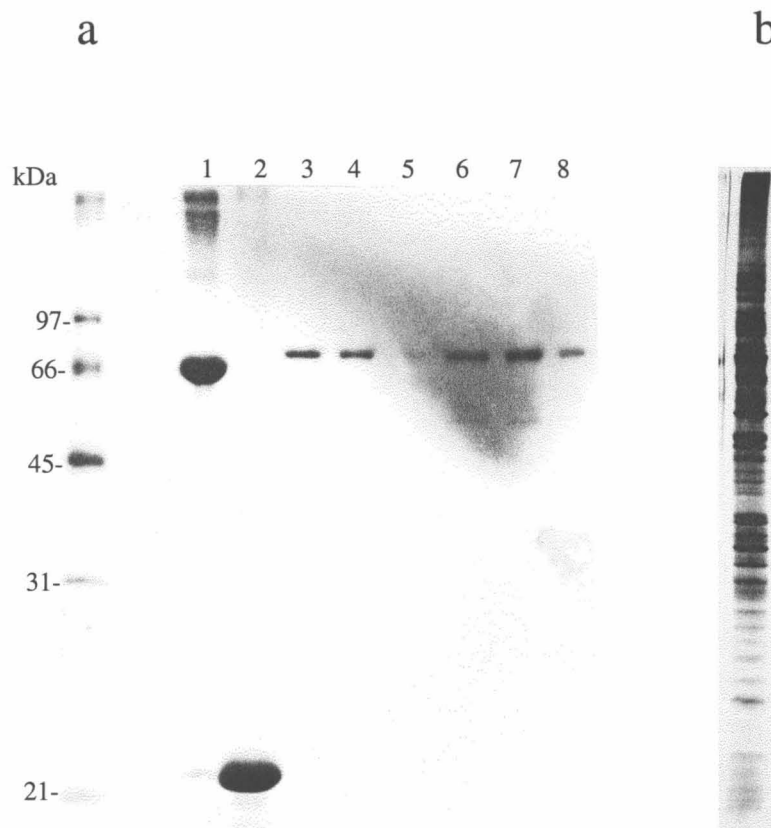


Abbildung 10a: Markierung der lysosomalen Membranproteine mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA

- 1) 100  $\mu\text{g}$  humanes Serumalbumin
- 2) 100  $\mu\text{g}$  Lysozym
- 3+4) 10  $\mu\text{g}$  lysosomale Membranen
- 5) 10  $\mu\text{g}$  angereicherte Enzymfraktion nach Methanol-Chloroform-Fällung
- 6+7) 50  $\mu\text{g}$  lysosomale Membranen
- 8) 50  $\mu\text{g}$  angereicherte Enzymfraktion nach Methanol-Chloroform-Fällung

Abbildung 10b: Silberfärbung von 10  $\mu\text{g}$  lysosomalen Membranen

### **5.7 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der nativen Acetyltransferase**

Durch Etablierung eines Free Flow Elektrophorese Gerät (Octopus) wurde es möglich, andere Methoden zur Aufklärung von Proteinen zu verwenden. Die kontinuierliche isoelektrische Fokussierung mit Hilfe des Octopus wurde als erste Methode (siehe 4.1) angewendet, um den isoelektrischen Punkt der Acetyltransferase zu ermitteln. Die Kenntnis des isoelektrischen Punktes der Acetyltransferase sollte den Bereich, in dem eine Identifizierung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgen könnte, eingrenzen und eine zielgerichtete Auswertung ermöglichen.

Als problematisch erwies sich für weitere Versuche, daß es nicht möglich war, ohne Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) zu arbeiten; nur so kam es zu einer gleichmäßigen Fraktionierung. Mit Wasser war nur bei hohem Flow eine gleichmäßige Fraktionierung zu erreichen, deshalb musste mit Additiven gearbeitet werden. Saccharose ist nicht zu empfehlen, da diese sehr schnell und sehr nachhaltig die Kapillarschläuche zusetzt und die Fraktionierung stoppt. Gute Erfolge erbrachte jedoch der Zusatz von 2 % HPMC. Damit wurde im wichtigen mittleren Bereich eine gleichmäßige Fraktionierung ohne Störung des Aktivitätstestes erreicht. Neue Probleme entstanden, wenn mit den aktiven Proben weiter gearbeitet werden sollte, denn das viskose HPMC störte jede anschließende Säulenchromatographie mittels FPLC oder HPLC und hätte somit vorher entfernt werden müssen. In diesem Fall war das jedoch nicht möglich, da das solubilisierter Enzym sehr schnell an Aktivität verlor und damit nicht mehr nachweisbar war. Eine weitere Anreicherung der AT mit Hilfe des Octopus-Gerätes erwies sich als schwierig, da bei der kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung den Puffern Methylcellulose (HPMC) zugesetzt werden musste, um einen laminaren Fluß durch die Kammer zu ermöglichen.

Die Free Flow Elektrophorese ermöglichte jedoch die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der nativen AT. Es wurde ein konstant reproduzierbarer IP im Bereich von pH 5,6-5,8 nach Solubilisierung des Enzyms ermittelt (siehe Abbildung 11,12, Fraktion 62-64). Der Vergleich mit dem durch Gelbasierende isoelektrische Fokussierung (s. 6.1.1) ermittelten isoelektrischen Punkt im Bereich von pH 5,4-5,6 sollte weitere Aufschlüsse über evtl. Übereinstimmung der Proteine zeigen.

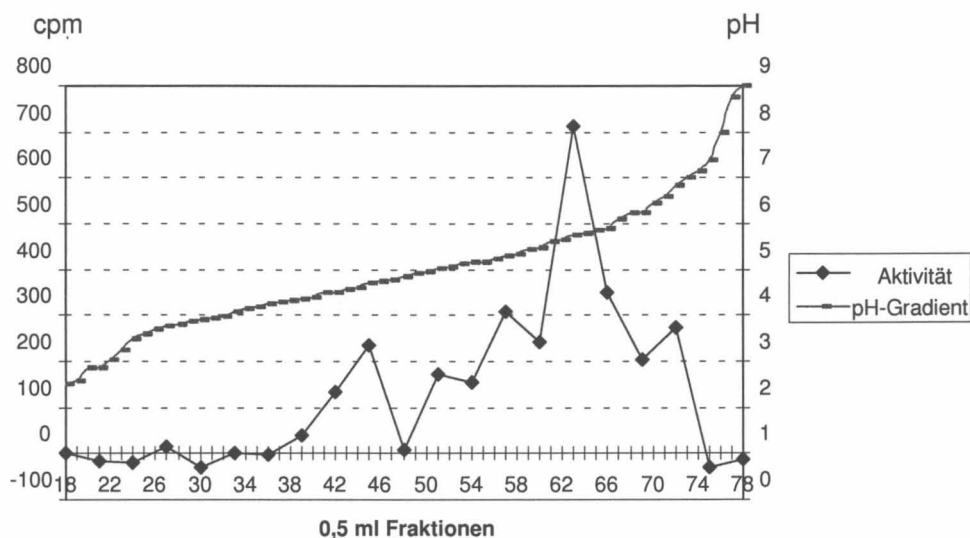


Abbildung 11: Kontinuierliche isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der aktiven Acetyltransferase. Es wurden 80  $\mu$ l (Protein-Konzentration 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) durch Ultrazentrifugation präparierte lysosomale Membranen mit 3 % TX-100 (Extraktionspuffer) solubilisiert und aufgetragen. Von Fraktion 18 bis 78 wurde von jeder 3. Fraktion ein Aktivitätstest durchgeführt.

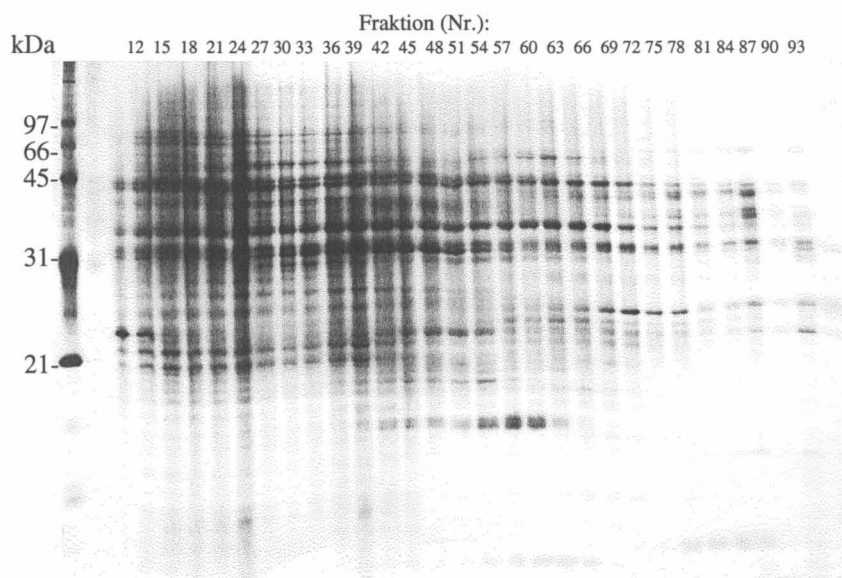


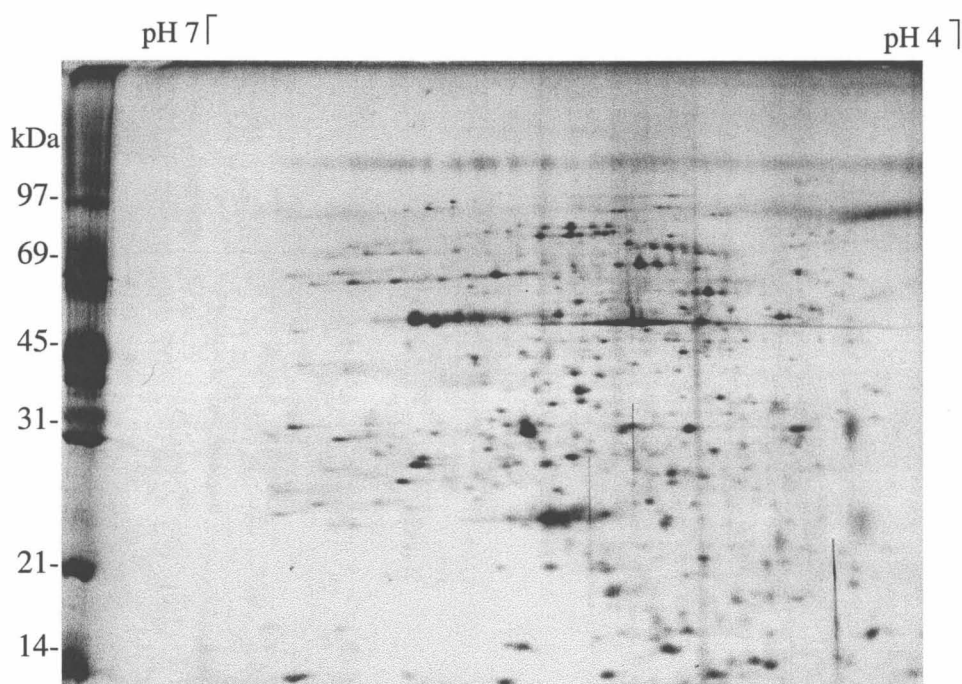
Abbildung 12: Silberfärbung der kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung zur Überprüfung der Proteintrennung: von Fraktion 12 bis 93 wurde jede 3. Fraktion aufgetragen.

## **5.8 Zweidimensionale (2D-)Gelelektrophorese lysosomaler Membranproteine**

Die Proben für die 2D-Gelelektrophorese wurden, wie unter 4.13 beschrieben, in der deionisierten und ergänzten Solubilisierungslösung aufgenommen. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe von Streifen mit immobilisierten pH-Gradienten zur isoelektrischen Fokussierung im Bereich 4-7. Die Quellung der Streifen mit den solubilisierten Proteinen erfolgte, wie unter 4.1.1 beschrieben.

### **5.8.1 Qualitätskontrolle und Reproduzierbarkeit der zweidimensionalen Trennung**

Das Ziel war die Identifizierung von Proteinen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Die Grundlage hierfür ist die Qualität und Reproduzierbarkeit von 2D-Gelen. Um Variationen zu vermeiden, die aufgrund von unterschiedlichem Ausgangsmaterial auftreten, wurden die "dichten Pools" aus mehreren Aufarbeitungen von humanen Placenten in der zweidimensionalen Trennung getestet. Von den ausgewählten "dichten Pools" wurde nun ein Enzym-Aktivitätsprofil erstellt. Hierzu wurde die Aktivität der lysosomalen Markerenzyme  $\beta$ -Hexosaminidase und N-Acetyltransferase bestimmt sowie der Proteingehalt gemessen. Nachdem gewährleistet war, über Ausgangsmaterial von gleicher Qualität zu verfügen, wurde das Proteinmuster mit dem aus der Dissertation von O. Dietrich (1996) verglichen und nach entsprechender Übereinstimmung wurde ein geeigneter "dichter Pool" für weitere Versuche ausgewählt.



*Abbildung 13: 2D-Gelelektrophorese lysosomaler Membranproteine aus Placenta*  
*Schwere Lysosomen aus dem "dichten Pool" wurden aufgebrochen und die Membranen durch Immunoaffinitäts-Reinigung präpariert. Es wurden ca. 10 µg Protein auf eine 2D-Gelelektrophorese aufgetragen und durch Färbung mit Silbernitrat sichtbar gemacht.*

### **5.8.2 Chemische Modifikation durch Behandlung mit Acetyl-CoA im pH-Bereich 5-6 in der zweidimensionalen Trennung**

Da die durch radioaktiv markiertes Acetyl-CoA erhaltene Markierung für eine zweidimensionale Trennung zu schwach war, wurde versucht, durch Inkubation mit Acetyl-CoA eine eventuelle Veränderung des Laufverhaltens der Proteine, bzw. die Veränderung des isoelektrischen Punktes durch Färbung mit Silbernitrat im zweidimensionalen Bild sichtbar zu machen.



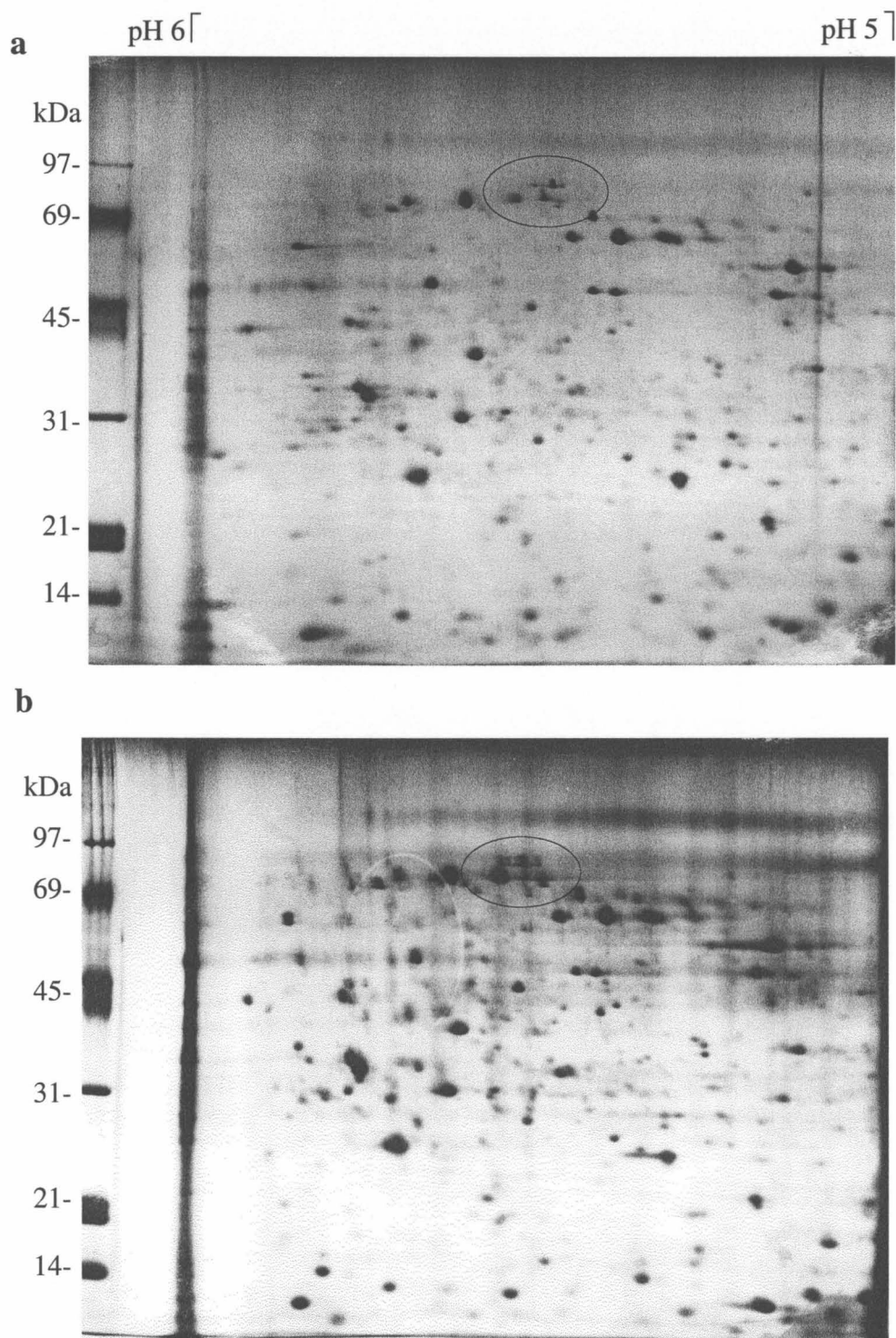


Abbildung 14: Silberfärbung der zweidimensionalen Trennung von 10  $\mu$ g lysosomaler Membranproteine im Bereich pH 5 bis 6

a) ohne Zugabe von Acetyl-CoA, b) nach Zugabe von 15 mM Acetyl-CoA

Die Bereiche in denen eine Veränderung durch die Zugabe von Acetyl-CoA vermutet wird, sind schwarz eingekreist.

Die Probe wurde mit 15 mM Acetyl-CoA versetzt und 5 Minuten bei 30 °C inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne Zugabe von Acetyl-CoA wurde gleich behandelt. Die Proben wurden weiterhin, wie unter 3.3 beschrieben, behandelt. Durch diesen Versuch sollte geprüft werden, ob überhaupt Veränderungen zu beobachten und weitere Untersuchungen mit angereicherten Enzymproben sinnvoll sind. In einer Gruppe von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 70-80 kDa im pH-Bereich um 5,5 traten sichtbare Veränderungen auf. Eine Identifizierung der Proteine in dem lysosomalen Pool war jedoch nicht möglich.

### **5.8.3 Zweidimensionale Auftrennung der Enzym-Fraktion**

Durch die Anreicherung der N-Acetyltransferase und Abtrennung verunreinigender Proteine durch die MonoQ-Säulenchromatographie konnte eine deutliche Eingrenzung aller in Frage kommenden Proteine erzielt werden.

Die so angereicherte Enzym-Fraktion wurde durch Ultrazentrifugation eingeeengt und umgepuffert und entsprechend für die zweidimensionale Gelelektrophorese vorbereitet.

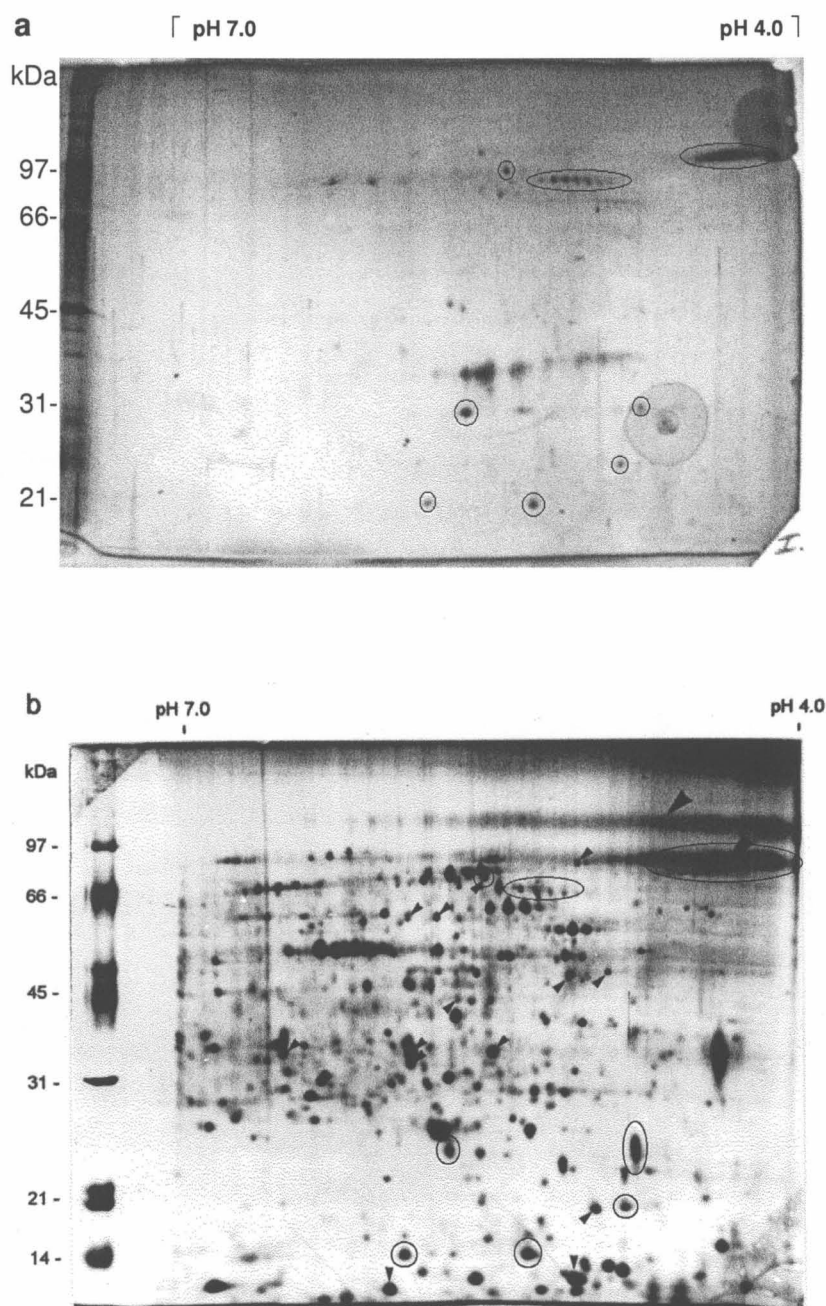


Abbildung 15: a) Zweidimensionale Auftrennung der durch eine MonoQ-Säulenchromatographie angereicherten Enzymfraktion, es wurden 70  $\mu\text{g}$  affinitätsgereinigte lysosomale Membranen eingesetzt. Als lysosomal identifizierte Polypeptide sind eingekreist;  
 b) 2D-Bild aus der Dissertation von O. Diettrich (1996), alle durch Immunoaffinitätsreinigung mit h-LAMP-2-Antikörpern angereicherte Proteine wurden mit schwarzen Pfeilen markiert und wurden zum Vergleich herangezogen.

#### 5.8.4 Chemische Modifikation der Enzym-Fraktion mit Acetyl-CoA mit DEPC

Durch die Behandlung mit Acetyl-CoA wurde in den zweidimensionalen Gelen eine Veränderung beobachtet. Als Hemmstoff für die Acetyltransferase wurde DEPC ermittelt (siehe 5.5.1 und 5.5.2). Das DEPC konkurriert mit dem Acetyl-CoA um die gleiche Bindungsstelle. Da das DEPC jedoch auch mit vielen anderen Gruppen reagiert, waren unterschiedliche Reaktionen zu erwarten. Einige Proteine waren nach der Behandlung unverändert (siehe Abbildung 16 und 17), die meisten Proteine jedoch sind nach Behandlung mit DEPC in einer Endkonzentration von 7 mM stark verändert, oder nicht mehr sichtbar. Dies deutet auf mehrfache Derivatisierung der meisten Polypeptide mit DEPC und einer daraus folgende Veränderung der Ladung hin. In Abbildung 16 sind durch Behandlung mit Acetyl-CoA und/oder DEPC in allen Versuchen nicht veränderten Polypeptide mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Mit einem weißen Pfeil sind die Polypeptide gekennzeichnet, die in Anwesenheit von Acetyl-CoA weniger verändert sind als in Abwesenheit.

Ein Beispiel ist in Abbildung 18 dargestellt. Nach Vergleich aller bisherigen Befunde:

1. der radioaktiven Markierung und deren Molekulargewicht
2. der isoelektrischen Fokussierung
3. der Überprüfung mit als lysosomal identifizierten Proteine in der zweidimensionalen Trennung
4. der Auftrennung der angereicherten Enzymfraktion
5. der Veränderung durch Behandlung mit Acetyl-CoA und der Hemmung durch DEPC konnte ein Protein als wahrscheinlicher Kandidat für das gesuchte Enzym ausgewählt werden.

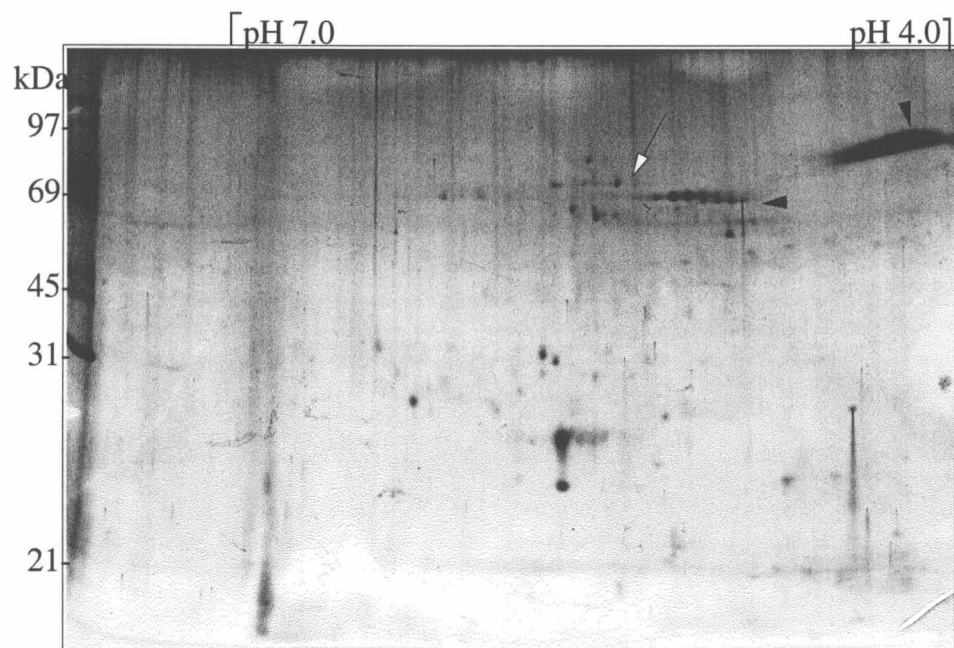


Abbildung 16: Kontroll-Ansatz der angereicherten Enzym-Fraktion nach Silberfärbung in der zweidimensionalen Darstellung zu den folgenden Abbildungen.

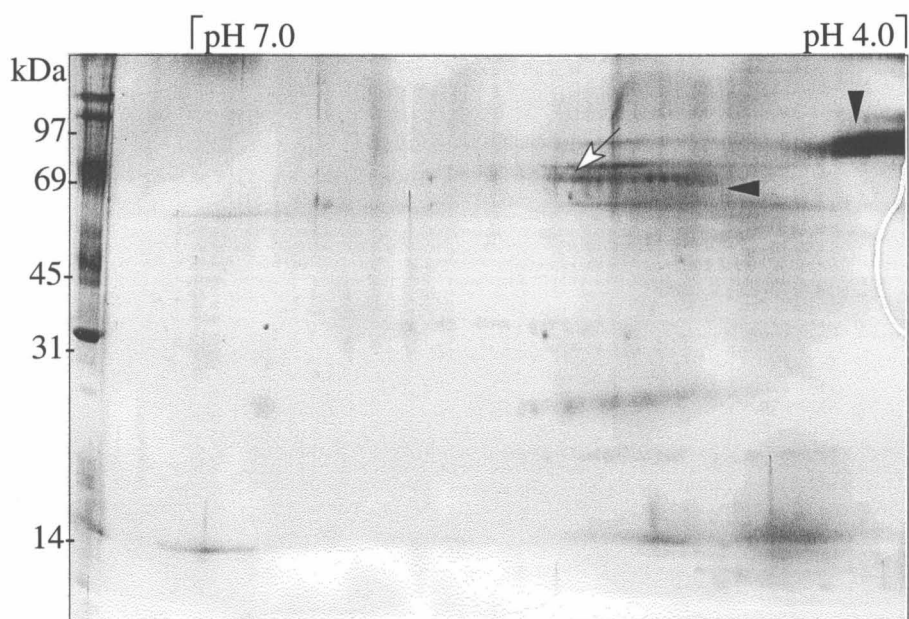
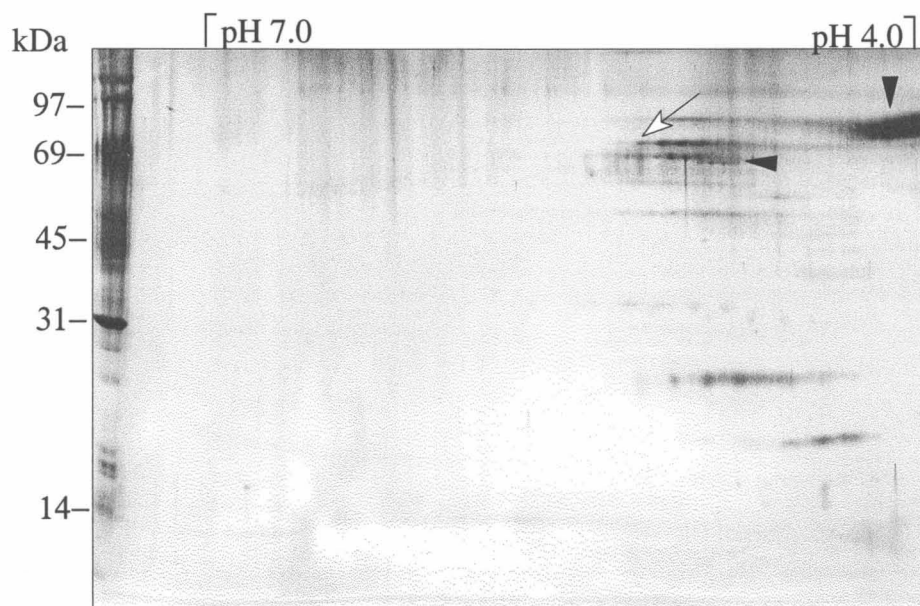
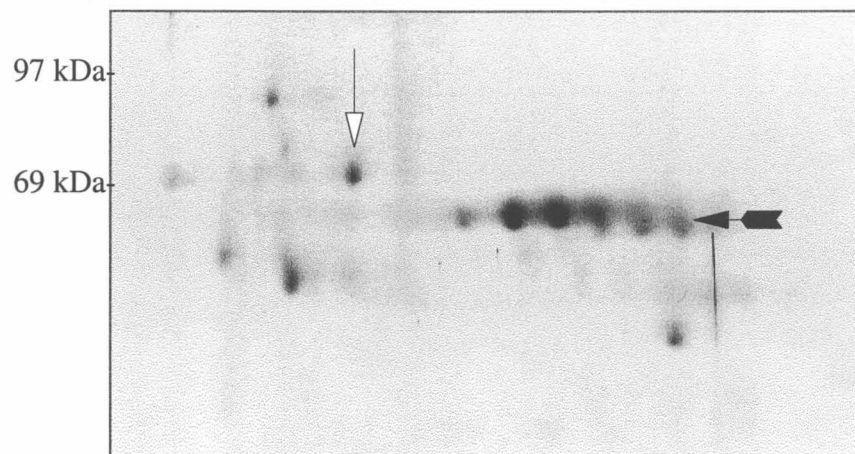
**a****b**

Abbildung 17: Silberfärbung der zweidimensionalen Darstellung der angereicherten Enzymfraktion nach DEPC-Behandlung a) ohne Acetyl-CoA, b) Nach vorheriger Zugabe von 15 mM Acetyl-CoA.

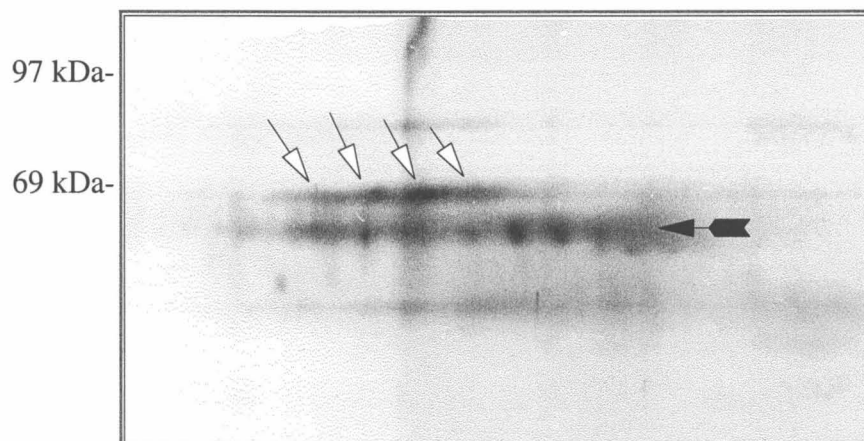
Schwarze Pfeilspitze: durch die Behandlung nicht veränderte Polypeptide, Weiße Pfeilspitze: in Anwesenheit von Acetyl-CoA weniger verändert als in seiner Abwesenheit



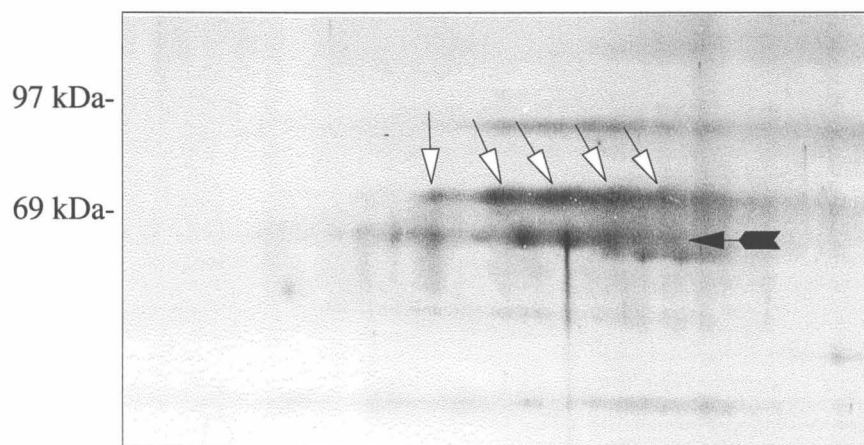
**a**



**b**



**c**



pH 5.8

pH 4.8

Abbildung 18: Stark kontrastierter Ausschnitt aus der Silberfärbung der zweidimensionalen Trennung im pH-Bereich 4 - 7 aus Abbildung 16 und 17a,b.

a) Kontrolle, b) Zugabe von DEPC, c) Zugabe von DEPC mit Acetyl-CoA

### 5.9 Versuche zur Hemmung des mit $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA markierten Proteins

Die Autoradiographie bestätigte eine eindeutige Hemmung durch DEPC. Durch Zugabe von Jodacetamid konnte keine Hemmung beobachtet werden, während die Zugabe von Essigsäureanhydrid nur eine sehr schwache Markierung erkennen lies. Die Theorie, daß die starke Markierung durch Kontamination mit Essigsäureanhydrid entstehen könnte, konnte somit verworfen werden. Es erscheint daher durchaus nicht unwahrscheinlich, daß hier die Acetyl-CoA:α-Glucosamin N-Acetyltransferase markiert wurde.

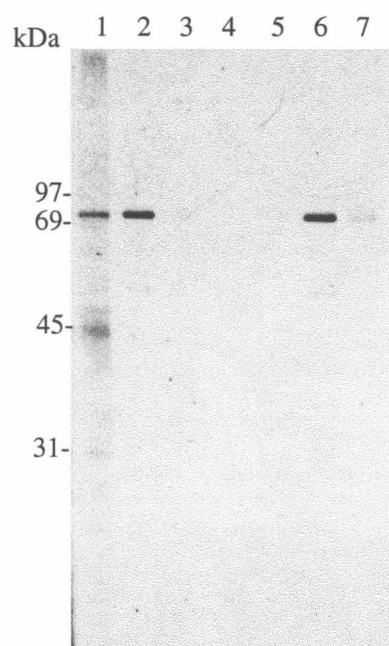


Abbildung 19: Radioaktive Markierung von lysosomalen Membranen mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA

Probe 1) 5 min Inkubation bei 30 °C

Probe 2-7) 5 sec Inkubation bei 30 °C . Es wurde -

Probe 3) mit 5 mM DEPC ; 4) mit 15 mM DEPC; 5) mit 50 mM DEPC; 6) mit 5 mM JAA

Probe 7) mit 5 mM Essigsäureanhydrid - vor der Markierung 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. 10 µg affinitätsgereinigte, lysosomale Membranproteine aus Placenta wurden mit 100 µCi  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA inkubiert.



## 6 Diskussion

Die Acetyl-Coenzym A: $\alpha$ -Glucosaminid-N-Acetyltransferase (AT) gehört zu den acht Enzymen, die für den Abbau von Heparansulfat im Lysosom notwendig sind. Zusammen mit der Acetyltransferase sind vier Sulfatasen und drei Exoglycosidasen an dem Abbau beteiligt. Diese Enzyme agieren sequentiell am nicht reduzierenden Ende der Heparansulfatkette und setzen Sulfat sowie Monosaccharide frei, die durch Transportsysteme ins Cytosol gelangen. Die Acetyltransferase ist notwendig um den N-terminalen Glucosaminrest beim Abbau des Heparansulfates zu acetylieren. Damit wird die Folgereaktion der  $\alpha$ -N-Acetyl-Glucosaminidase ermöglicht um den  $\alpha$ -N-Acetyl-Glucosamin-Rest abzuspalten. Die Transferase überträgt Acetyl-Gruppen ausgehend von cytosolischem Acetyl-CoA durch die lysosomale Membran auf in der lysosomalen Matrix lokalisierte Heparansulfatfragmente. Diese Reaktion stellt einen essentiellen Zwischenschritt im Heparansulfat-Abbau dar, dessen Ausfall zur lysosomalen Speicherung von Heparansulfat führt. In vererbter Form wird dieser Defekt bei dem Sanfilippo C-Syndrom manifest.

Die Acetyltransferase ist wahrscheinlich ein integrales Membran-Protein und es wurde ein transmembraner Acetylierungsmechanismus postuliert. Der Reaktionsmechanismus wurde von Bame & Rome (1985) untersucht. Als Ausgangsmaterial wurden gereinigte lysosomale Membranen aus Rattenleber verwendet. Um die Enzymreaktion zu verfolgen, wurde die Acetylierung von Glucosamin, einem Monosaccharid-Akzeptor, gemessen. Die Enzymreaktion war bei einem pH-Wert oberhalb von 5,5 optimal. Die Acetyltransferase hat ein breites pH-Optimum von pH 6-8 (Crain *et al.* 1982). Inhibitorstudien weisen darauf hin, daß das Enzym nach einem Di-Iso Ping Pong Bi Bi Mechanismus wirkt. Eine Hemmung der Enzymaktivität wurde durch N-Bromosuccinimid (NBS) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) nachgewiesen. Dementsprechend wurde die Beteiligung eines Histidinrestes vermutet. Diese chemischen Modifikationen deuten darauf hin, daß im aktiven Zentrum des Enzyms ein essentieller Histidin-Rest lokalisiert ist (Bame & Rome 1986).

Weitere Nachweise, um den transmembranen Acetylierungsmechanismus zu bestätigen, lieferten die Charakterisierung der Teil-Reaktionen des Enzyms durch radioaktive Markierungen. Membranen, die mit Acetyl-CoA und  $^3\text{H}$ -CoA inkubiert wurden, produzierten

Acetyl- $^3\text{H}$ -CoA. Dieser Austausch war optimal bei pH-Werten über 7,0. Die Behandlung der Membranen mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA hingegen resultierte in der Bildung eines Acetyl-Enzym-Intermediates. Der Transfer der Acetyl-Gruppe vom Enzym zum Glucosamin war optimal zwischen pH 4 und 5. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß das Acetyl-CoA nicht die lysosomale Membran durchquert.

Nach dem Modell von Bame & Rome (Abbildung 20) wird die AT auf der cytoplasmatischen Seite des Lysosoms acetyliert. Die Acetyl-Gruppe wird weiterhin zur Innenseite transferiert und dort zur Acetylierung von terminalen Glucosaminresten im Heparansulfat verwendet.

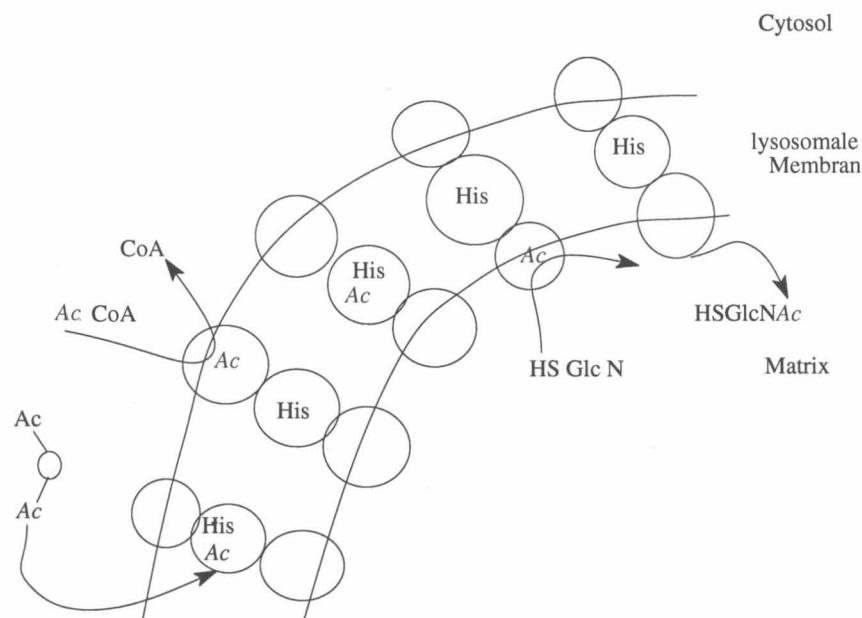


Abbildung 20: Schema zum Transfer der Acetyl-Gruppe durch die lysosomale Membran (verändert nach Bame & Rome 1986)

## 6.1 Die Markierung

Die radioaktive Markierung von Proteinen mit tritiummarkiertem Acetyl-Coenzym A ergab ein erstaunliches Bild:

Die Fluorographie zeigte zwei deutlich markierte Proteine unterschiedlicher Intensität. Das sehr stark markierte Protein hatte ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa und das zweite Protein zeigte eine schwache, aber ebenfalls sehr deutliche Bande in der Größe von ca. 53 kDa.

### 6.1.1 Isoelektrische Fokussierung

Durch isoelektrische Fokussierung in einem Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten konnten die isoelektrischen Punkte der radioaktiv markierten Proteine ermittelt werden. Trotz sehr schwacher Markierung waren aber auch hier eindeutig zwei Proteine unterschiedlicher Intensität erkennbar. Die relative Intensität der Punkte entsprach der Intensität der beiden Banden. Sie lagen dicht nebeneinander im pH-Bereich von 5,4 bis 5,6.

Eine Auftrennung in der zweiten Dimension wäre hier von großem Interesse gewesen, war jedoch nicht möglich. Vermutlich wanderten die markierten Proteine nicht oder nur zu einem kleinen Teil in die zweite Dimension ein. Daraufhin wurde vorerst vergeblich versucht, ein tritiummarkiertes Acetyl-CoA mit einer spezifischen Aktivität von über 30 mCi/mmol (bisher maximal 15 mCi/mmol) zu erwerben. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch nur ein  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA mit einer spezifischen Aktivität von 7 mCi/mmol erhältlich, so daß eine zweidimensionale Auftrennung der markierten Proteine nicht möglich war.

### 6.1.2 Zeitabhängigkeit der Markierung

Durch verschiedene Inkubationszeiten sollte der Markierungsmechanismus sowie Dauer und Stabilität der Markierung untersucht werden. Das markierte Protein mit dem höheren Molekulargewicht zeigte bei diesen zeitabhängigen Markierungsversuchen, daß die Markierung bereits ohne zusätzliche Inkubation bei 30 °C erfolgte, sehr schnell ein Maximum erreichte und bis zur 5. Minute wieder stark abnahm (siehe Abbildung 4 und 5). Weitere Versuche zeigten, daß die Markierung nicht stabil, nicht dauerhaft und die Markierungsausbeute rückläufig war.

Dies lieferte einen ersten Anhaltspunkt dafür, daß es sich bei dem Protein mit dem Molekulargewicht von 75 kDa um das Gesuchte handeln könnte.

Die Zeitabhängigkeit der Inkubation zur Markierung ließ auf eine enzymatische Reaktion schließen. Auch wurde das Markierungsmuster (Abbildung 4) nach längerer Inkubationszeit stabil.

### **6.1.3 Nachweis radioaktiv markierter Polypeptide in lysosomalen Membranen aus normalen und Sanfilippo C (SFC) -Fibroblasten**

Die  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA-Markierung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Patienten-Fibroblasten, da ausser den zwei markanten noch eine ganze Serie anderer Proteine mit ähnlicher Intensität markiert wurden. Es kann sich bei dem gesuchten Enzym um einen Teil eines Multienzymkomplexes, um ein assoziiertes Enzym oder um eine Punktmutation handeln. Daher kann der Defekt des Enzyms ohne Änderung des Molekulargewichts erfolgen und deshalb auch ohne Veränderung in der Markierung. Die unspezifische Markierung in den Fibroblasten-Membranen erschwert zudem eine gezielte Auswertung und die Auftrennung in der zweiten Dimension brachte kein Ergebniss, da auch hier die Intensität der Markierung nicht ausreichte.

Es ist nicht auszuschliessen, daß die Bande mit dem SFC-Enzym zu tun hat. Die Markierung ist erfolgt, ähnlich wie bei der Kontrolle. Man konnte jedoch nicht daraus schließen, daß die Mutationen sich auf einen späteren Schritt als die Acetylierung des Enzyms auswirken.

Die Reaktion erfolgt wahrscheinlich über mehrere Stufen, doch der Defekt kann ebenso eine andere Stufe als die zwischenzeitliche Acetylierung des Enzyms beeinträchtigen. Für die Untersuchung standen leider nur 2 Fibroblastenlinien zur Verfügung.

## **6.2 Etablierung eines Assays zur weiteren Identifizierung des Proteins**

Für eine Aufklärung der Identität der markierten Proteine war es notwendig, neue Strategien zu entwickeln. Als Basis neuer Versuche wurde ein Assay zur Aktivitätsbestimmung der Acetyltransferase entwickelt. Diese Bestimmung basiert auf einem im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten und routinemäßig schnell durchführbaren Assay zur Aktivitätsbestimmung. Der Assay wurde mittels eines Kationenaustauschers mit tritiummarkiertem Glucosamin und Acetyl-CoA durchgeführt (siehe 4.8.3. und 5.3). Die Aktivitätsbestimmung ermöglichte eine

Anreicherung und Inhibitorstudien für das gesuchte Enzym. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der nativen Acetyltransferase mittels einer Free Flow Elektrophorese Gerätes wurde durch den neuen Assay ebenfalls ermöglicht.

### 6.2.1 Inhibitorstudien

Für die Acetyltransferase wurde schon in früheren Arbeiten eine Hemmung der Enzymaktivität durch N-Bromosuccinimid (NBS) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) nachgewiesen (Bame & Rome, 1986). Die Hemmung durch NBS konnte in lysosomalen Membranen aus humaner Placenta nicht bestätigt werden, aber durch DEPC konnte eine deutliche Hemmung der Acetyltransferase beobachtet werden (siehe Abbildung 8a,b). Die Hemmung durch DEPC konnte im Zellhomogenat von Kontrollfibroblasten nachgewiesen werden. Durch Zugabe von Acetyl-CoA wurde kein Schutzeffekt beobachtet, möglicherweise ist die DEPC sensitive Gruppe nicht in unmittelbarer Nähe der Bindungsstelle für das Acetyl-CoA.

### 6.2.2 Anreicherung der Acetyl-CoA:α-Glucosaminid N-Acetyltransferase (AT)

Die Anreicherung der Acetyl-CoA:α-Glucosaminid N-Acetyltransferase (AT) wurde durch Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ HR5/5 Säule erreicht. In diesem Schritt reicherte sich die spezifische Aktivität der AT in den durch Immunoaffinität angereicherten lysosomalen Membranen um das 30-fache an. Das durch Triton X-100 solubilisierete Enzym verlor jedoch sehr schnell an Aktivität und die enzymatisch aktive Säulenfraktion konnte nur durch den neuen, innerhalb einer Stunde durchführbaren, Assay ermittelt und weiterverarbeitet werden. Die geringe Haltbarkeit des solubilisierten Enzyms war ein Problem, denn schon nach ca. 1-2 Tagen trat ein völliger Aktivitätsverlust ein. Es war nicht möglich, die Aktivität der AT zu stabilisieren. Das Problem konnte durch ein Einfrieren des Enzyms nicht behoben werden, da Frier-/Tauschritte den Aktivitätsverlust noch beschleunigten. Das solubilisierete Enzym wurde bei 4° C aufbewahrt und möglichst zügig weiterverarbeitet, die weiteren Arbeitsschritte wurden dadurch jedoch limitiert.

### 6.3 Überprüfung der Spezifität der radioaktiven Markierung

Die Isolierung des angereicherten, mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA markierten Enzyms erwies sich als problematisch, da es solubilisiert und nicht mehr mit anderen lysosomalen Membranproteinen mittels gegen diese gerichtete Antikörper via Kopplung an C1Z-Perlen angereichert werden konnte (siehe Abbildung 10a). Die solubilisierte Enzymprobe wurde durch Ultrafiltration eingeeengt, und nach der Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA wurde die nichtgebundene Radioaktivität mit Hilfe einer Methanol-Chloroform-Fällung herausgewaschen.

Nach der Fällung konnte nur noch eine schwache Markierung beobachtet werden. Es ist nicht klar, ob die Probe zur Zeit der Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA eine verminderte Aktivität besaß oder es zu einem Verlust der Markierung während der Fällung gekommen ist. Die Fällung war notwendig, weil das Enzym in der Fraktion Nr. 6 in einer löslichen Form vorlag. Trotz Unklarheiten kann aus dem Ergebniss eine wichtige Schlussfolgerung gezogen werden: Das nach der Chromatographie mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA-markierbare Protein ist in derselben Fraktion (#6) wie die Acetyltransferase-Aktivität gefunden worden.

Das radioaktiv markierte Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa ist in der Markierung relativ stärker vertreten als in der Silberfärbung der lysosomalen Membranen. Daher ist es möglich, daß es sich bei dem in der Membranpräparation prominent markierten Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa um ein Enzym handeln könnte, das sich besonders leicht acetylieren läßt, möglicherweise um die Acetyltransferase selbst.

Um die Spezifität der Markierung zu prüfen, wurden zusätzlich humanes Serumalbumin und Lysozym ohne lysosomale Membranen mit  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA inkubiert. Nach der Autoradiographie zeigte sich, daß beide zugesetzten Proteine sehr stark markiert waren (siehe Abbildung 10a). Die Stärke der Markierung kann aus der zehnfach höheren Proteinmenge resultieren. Da die Proteine auch in Abwesenheit von lysosomalen Membranen markiert werden, muss es wahrscheinlich zu einer nicht-enzymatischen Markierung der zugesetzten Proteine kommen. Aus der Beobachtung kann geschlossen werden, daß die Markierung nicht-enzymatisch erfolgen könnte. Es war nicht möglich vom Lieferanten des  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA zu erfahren, mit welcher Methode die radioaktive Substanz hergestellt wird. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß dabei radioaktives Essigsäureanhydrid verwendet wurde und daß das Produkt mit diesem Reagenz kontaminiert war.

Bekannt sind jedoch auch nicht-enzymatische Reaktionen von Acetyl-CoA mit Proteinen, z.B. von Histonen (Schnolzer *et al.*, 2005) und Hämoglobin (Abraham & Garbutt, 1981). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine nicht-enzymatisch erfolgte Markierung der Membranproteine handelt.

Die Bereitschaft zu einer nicht-enzymatischen Reaktion kann sehr unterschiedlich sein, es wurden charakteristisch wenige Polypeptide detektiert, deren Markierungsintensität nicht dem Proteinmuster der Membranpräparation entsprechen (siehe Abbildung 10b).

Die auffällig starke Markierung des Albumins und des Lysozyms ist wahrscheinlich auf die hohe Menge (100 µg) zurückzuführen, in dem diese Proteine im Ansatz vorlagen. Der Proteingehalt in dem Membranextrakt entsprach 10 µg, daher war jedes einzelne Polypeptid um drei oder mehr Größenordnungen weniger vertreten als das Albumin bzw. Lysozym.

Es ist trotzdem nicht auszuschliessen, daß es sich bei dem prominent markierten Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa um die Acetyltransferase handeln könnte.

Die Proteinfärbung mit Silbernitrat zeigt ein heterogenes Muster das gänzlich anders ist, als die vorübergehende Markierung der 75 kDa-Bande, diese ist einmalig im Vergleich zum Gesamt-Protein.

#### **6.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der nativen Acetyltransferase**

Mit einem Free Flow Elektrophorese Gerät (Octopus) wurde es möglich, andere Methoden zur Reinigung von Proteinen zu etablieren. Die kontinuierliche isoelektrische Fokussierung wurde angewendet, um den isoelektrischen Punkt der nativen AT zu ermitteln. Es wurde ein konstant reproduzierbarer IEP im Bereich von pH 5,6-5,8 nach Solubilisierung des Enzyms ermittelt. Der Vergleich mit dem durch Gelbasierende isoelektrische Fokussierung (s. 6.1.1) ermittelten isoelektrischen Punkt im Bereich von pH 5,4-5,6 sollte weitere Aufschlüsse über evtl. Übereinstimmung der Proteine zeigen. Durch die Denaturierung der Proteine im SDS-Gel ist eine leichte Verschiebung des isoelektrischen Punktes zu erwarten, so daß eine Änderung des IEP von pH 5,6-5,8 um 0,2 pH-Einheiten zu erwarten wäre. Es könnte sich also durchaus um ein identisches Protein handeln. Eine weitere Anreicherung der AT mit Hilfe des Octopus-Gerätes erwies sich als schwierig, da bei der kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung den Puffern Methylcellulose (HPMC) zugesetzt werden musste, um einen laminaren Fluß durch die Kammer zu ermöglichen. Da HPMC jedoch bei chromato-



graphischen Reinigungsschritten stört müsste es entfernt werden. Bei der AT war dies nicht möglich, da das solubilisierter Enzym sehr schnell an Aktivität verlor und damit nicht mehr nachzuweisen war.

### **6.5 Zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese der angereicherten Enzym-Fraktion**

Die Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ HR5/5 Säule bei einem neutralen pH-Wert von 7,0 erbrachte eine deutlichen Anreicherung der AT um den Faktor 30 aus gereinigten lysosomalen Membranen. Da die AT bei pH 7,0 an die MonoQ HR5/5 Säule bindet, weist darauf hin, dass es sich um ein schwachsaures Protein handelt. Da das empfindliche, solubilisierter Enzym keine weiteren säulenchromatographischen Reinigungsschritte zuließ, wurde nun versucht, durch zweidimensionale Darstellung mehr Informationen über die AT zu erhalten.

Die zweidimensionale Trennung der angereicherten AT-Fraktion in der SDS-Page sollte alle in Frage kommenden Kandidaten darstellen. In der Dissertation von Diettrich (1996) wurden Proteine in der zweidimensionalen SDS-Page durch Immunoaffinitäts-Reinigung als angereicherte lysosomale Membranproteine identifiziert. Durch Vergleich der zweidimensionalen Muster wurden Kandidaten für die angereicherte Acetyltransferase identifiziert, die mit den angereicherten lysosomalen Membranproteinen in Deckung zu bringen waren. Hierbei traten zwei Punkte besonders hervor, von denen der eine bisher als LIMP-2 postuliert worden ist. Der andere Punkt in der 2D-Elektrophorese ist der nach Überprüfung des isoelektrischen Punktes der vielversprechendste Kandidat für das gesuchte Enzym.

Als Markerenzym in der zweidimensionalen Trennung wurde das durch Massenspektrometrie kürzlich identifizierte Aktin verwendet (unveröffentlichte Ergebnisse, mündliche Mitteilung O. Diettrich), das einen isoelektrischen Punkt von 5,5 und ein Molekulargewicht von 42 kDa hat. Aktin hat einen ähnlichen IEP wie das lysosomal angereicherte Protein, das vielleicht ein Kandidat für die Acetyltransferase sein könnte und kann somit sehr gut als Orientierungshilfe in den zweidimensionalen Mustern dienen. Bei der zweidimensionalen Suche wurde nach einem Polypeptid als Bestandteil des Enzyms oder Enzymkomplexes gesucht und es wurde ein Kandidat gefunden dessen weitere Identifizierung aussichtsreich erschien.



## 6.6 Chemische Modifikationen

Durch chemische Modifikationen mit DEPC und Acetyl-CoA in der angereicherten MonoQ-Säulenfraktion sollten Anhaltspunkte für die Identifizierung der Acetyltransferase in der zweiten Dimension erlangt werden. Die Ergebnisse von Bame & Rome (1986) weisen darauf hin, daß N-Acetylhistidin im acetylierten Enzym-Intermediat der Acetyltransferase Reaktion nach der Co-Inkubation mit Acetyl-Coenzym A vorhanden sein könnte.

Die Bildung eines acetylierten Intermediats bewirkt den Schutz des Enzyms vor Inaktivierung durch Diethylpyrocarbonat (DEPC). DEPC reagiert mit Histidin und bildet ein N-Carbethoxyhistidyl-Derivat. DEPC und die Acetyl-Gruppe des Acetyl-CoA konkurrieren offenbar um die gleiche Stelle am Histidin, folglich schützt Acetyl-CoA das Enzym vor Inaktivierung.

Es könnte daher erwartet werden, daß in der zweidimensionalen Auftrennung der Probe, die mit DEPC inkubiert wurde, eine Verschiebung des AT-Kandidaten in den sauren Bereich stattfinden würde. Diese Vermutung konnte bestätigt werden.

Dagegen wurde in der Probe, die mit Acetyl-CoA und DEPC inkubiert wurde, eine weitere Verschiebung in den sauren Bereich beobachtet. Es wurde angenommen, dass DEPC und Acetyl-CoA um die gleiche Bindungsstellen konkurrieren und daher wurde eine schwächere Verschiebung ins Saure erwartet. Die beobachtete Verschiebung deutete an, dass durch die Behandlung mit Acetyl-CoA basische Gruppen neutralisiert worden sind.

Bei der Untersuchung der Anreicherung der AT wurden mehrere Anhaltspunkte gefunden, die die Identifizierung und Charakterisierung dieses Membranproteins vielleicht ermöglichen werden. Auf Grund dieser Beobachtungen wird es von Interesse sein, künftig dieses Protein in Zellen von SFC-Patienten zu untersuchen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

Seit dem Abschluss dieser experimentellen Arbeit wurden folgende Publikationen veröffentlicht, die 2006 zur Identifizierung des Proteins führten.

2004 wurde durch die von Ausseil *et al.* publizierten Ergebnisse gezeigt, dass die Acetyltransferase auf dem Chromosom 8 lokalisiert ist. Dies wurde durch anhand einer Studie von 55 Personen, davon 37 Patienten mit Mucopolysaccharidose IIIC dargestellt.

Durch Vergleich der Familienstammbäume, Blutanalysen und Zellkulturen aus Hautfibroblasten wurde die Lokalisierung des Gens für die Acetyltransferase in einer

pericentromerischen Region des Chromosoms 8 (Ausseil und Pshezhetsky 2004) durch Chromosomenmarker gefunden.

Diese Befunde wurden in der Publikation von Seyrantepé und Pshezhetsky 2006 bestätigt. Die Transfektion von Zellen von Mucopolysaccharidose IIIC- Patienten mit einem normalen humanem Chromosom 8 konnte die Enzymdefizienz beheben.

2006 wurde von Ausseil und Pshezhetsky ein acetyliertes 120 kDa lysosomales Transmembran-Protein als Kandidat für die humane Acetyltransferase beschrieben. Nach Einbeziehung aller aktuellen Veröffentlichungen besteht jedoch Zweifel daran, dass das von Ausseil und Pshezhetsky 2006 beschriebene Protein (MG 240 kDa mit 120 kDa Untereinheiten) tatsächlich die humane Acetyltransferase darstellt.

Zeitgleich wurde von Hrebicek *et al.* (2006) und Fan *et al.* (2006) die Identifizierung der cDNA der Acetyltransferase veröffentlicht die zu der gleichen Sequenz führte und als TMEM76 angegeben worden ist und die vorigen Ergebnisse bestätigte.

Der theoretische MG-Wert des humanen TMEM76 Proteins liegt bei 68148,5 Da (Hrebicek *et al.*, 2006), (Fan *et al.*, 2006). Diese Angaben beider Gruppen unterscheiden sich am N-Terminus und in der Gesamtlänge.

Die in dieser Arbeit vorgeschlagenen Werte lassen sich mit denen des TMEM76 vergleichen. Die Molekulargewichte von ca. 68 kDa und 75 kDa liegen nah beieinander.

Der theoretische IEP von TMEM76 liegt bei 8,27 und unterscheidet sich damit um ca. zwei pH-Einheiten von dem in dieser Arbeit beobachteten IEP der durch kontinuierliche isoelektrische Fokussierung ermittelt wurde. Dies lässt sich durch die Anwesenheit von ca. 10-15 Sialinsäureresten (entsprechend 4 (Hrebicek *et al.*, 2006) theoretischen Glykosylierungsstellen) erklären.

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen in dieser Arbeit ermittelten und weisen auf einen IEP im Bereich von pH 5,6 bis 6,0 hin. Die verschiedenen isoelektrischen Punkte die ermittelt wurden können auch aus den unterschiedlichen Ausgangsmaterial wie Mäuseleber, humane Placenta und Fibroblasten resultieren. Das Protein wurde durch genetische Analyse identifiziert, Methoden die zu der Zeit als der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, noch nicht zur Verfügung standen.

## 7 Zusammenfassung

Die Resultate der vorliegenden Arbeit lassen sich gemäß Zielsetzung in folgende Punkte unterteilen:

- 1.) Mit tritiummarkiertem Acetyl-Coenzym A wurden in affinitätsgereinigten lysosomalen Membranen aus humaner Placenta deutlich zwei Proteine markiert. Ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa wurde sehr stark markiert und das zweite Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa zeigt eine schwache, aber ebenfalls sehr deutliche Bande. Die isoelektrischen Punkte im pH-Bereich von 5,4 bis 5,6 dieser radioaktiv markierten Proteine konnten durch isoelektrische Fokussierung in einem Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten ermittelt werden.
- 2.) Zur weiteren Überprüfung wurden affinitätsgereinigte lysosomale Membranen aus Sanfilippo C-Fibroblasten mit dem genetischen AT-Defekt und humane Fibroblasten ohne genetischen Defekt mit tritiummarkiertem Acetyl-Coenzym A markiert. Diese Markierung ergab keinen signifikanten Unterschied, da neben den zwei markanten Proteinen eine ganze Serie anderer Proteine mit ähnlicher Intensität markiert wurden.
- 3.) Als Basis neuer Versuche wurde ein Assay zur Aktivitätsbestimmung entwickelt. Diese schnell durchführbare Aktivitätsbestimmung ermöglichte Inhibitorstudien mit verschiedenen Hemmstoffen.
- 4.) Durch die Solubilisierung der AT in enzymatisch aktiver Form und des etablierten Enzym-Assays wurde eine Anreicherung des Enzyms mittels FPLC und einer MonoQ-Säule ermöglicht.
- 5.) Der Enzym-Assay und die Solubilisierung der AT in enzymatisch aktiver Form und die neu etablierte kontinuierliche isoelektrische Fokussierung führten zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes des aktiven Enzyms im pH-Bereich 5,6 bis 5,8.
- 6.) Durch Auftrennung der angereicherten Säulenfraktion in der zweidimensionalen Elektrophorese konnten durch Vergleich mit den als lysosomal identifizierten Proteine mögliche Kandidaten für das gesuchte Enzym eingegrenzt werden.
- 7.) Chemische Modifikationen des Enzyms ermöglichten im zweidimensionalen Gelelektrophorese-Bild eine weitere Eingrenzung der Kandidaten für die Acetyl-Coenzym A:  $\alpha$ -Glucosaminid-N-Acetyltransferase.

## ***Danksagungen***

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andrej Hasilik für die interessante Themenstellung und die verständnisvolle Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Dr. Ole Diettrich danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit im Labor und die vielen Diskussionen in Münster, Marburg und zuletzt in London.

Allen Kollegen, im Besonderen Steffi Meyer, Thomas Stein und Traudl Jarosch danke ich für die viele Hilfe bei der Aufarbeitung humaner Placenten, den unzähligen qualitativ gleichbleibenden Gelelektrophoresen, Trennungen mittels FPLC und isoelektrischer Fokussierung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Bernd Kösters, der mir bei der Erstellung des Manuskripts und beim Korrekturlesen sehr geholfen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura an der Universität Göttingen bedanke ich mich für die Betreuung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz an der Universität Göttingen bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates der Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken die mir geholfen haben, neben Berufstätigkeit und Familie die Arbeit nach langer Pause fertigzustellen. Vor allem meinen Eltern die durch Ihre Unterstützung und Betreuung meiner Tochter dies erst ermöglicht haben.

## 8 Literatur

- Akasaki, K., A. Michihara, M. Fukuzawa, H. Kinoshita, H. Tsuji: Cycling of an 85-kDa Lysosomal Membrane Glycoprotein between the Cell Surface and Lysosomes in Cultured Rat Hepatocytes. *J. Biochem.* **116**, 670-676 (1994).
- Ausseil, J., J.C. Loredó-Osti, A. Verner, C. Darmond-Zwaig, I. Maire, B. Poorthuis, O.P. van Diggelen, T.J. Hudson, T.M. Fujiwara, K. Morgan, A.V. Pshezhetsky: Localisation of a gene for mucopolysaccharidosis IIIC to the pericentromeric region of chromosome 8. *J. Med. Genetics* **12**, 941-945 (2004).
- Ausseil, J., K. Landry, V. Seyrantepe, S. Trudel, A. Mazur, F. Lapointe, A.V. Pshezhetsky: An acetylated 120-kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC fibroblasts: A candidate molecule for MPS IIIC. *Mol. Genetics and Metabolism* **87**, 22-31 (2006).
- Bame, K.J., L.H. Rome: Acetyl-coenzyme A:  $\alpha$ -glucosaminide *N*-acetyltransferase; Evidence for a transmembrane acetylation mechanism. *J. Biol. Chem.* **260**, 11293-11299 (1985).
- Bame, K.J., L.H. Rome: Acetyl-coenzyme A:  $\alpha$ -glucosaminide *N*-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **261**, 10127-10132 (1986).
- Blagoveshchenskaya, A.D., J.P. Norcott, D.F. Cutler: Lysosomal Targeting of P-selectin is Mediated by a Novel Sequence within its Cytoplasmic Tail. *J. Biol. Chem.* **273**, 2729-2737 (1998).
- Brooks, D.A.: Review: The Immunochemical Analysis of Enzyme from Mucopolysaccharidoses Patients. *J. Inher. Metab. Dis.* **16**, 3-15 (1993).
- Burnside, J., D.L. Schneider: Characterization of the membrane proteins of rat liver lysosomes. Composition, enzyme activities and turnover. *Biochem. J.* **204**, 525-534 (1982).
- Carlsson, S.R., J. Roth, F. Piller, M. Fukuda: Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* **263**, 18911-18919 (1988).
- Chen, J.W., T.L. Murphy, M.C. Willingham, I. Pastan, J.T. August: Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J. Cell Biol.* **101**, 85-95 (1985).
- de Duve, C. in: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Herausgegeben von J.T. Dingle und H.B. Fell. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, **Vol. 1**, 3-40 (1969).
- de Duve, C., B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans: Tissue fractionation studies. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* **60**, 604-617 (1955).
- Di Natale, P., T. Annella, A. Daniele, T. De Luca, E. Morabito, R. Pallini, P. Rosario, G. Spagnuolo: Biochemical Diagnosis of Mucopolysaccharidoses: Experience of 297 Diagnoses in a 15-year Period (1977-1991). *J. Inher. Metab. Dis.* **16**, 473-483 (1993).
- Di Natale, P., N. Pannone, G. D'Argenio, R. Gatti, R. Ricci, C. Lombardo: First-trimester prenatal diagnosis of Sanfilippo C disease. *Prenatal Diagnosis*, **Vol. 7**, 603-605 (1987).
- Dittrich, O., F. Gallert, A. Hasilik: Purification of lysosomal membrane Proteins from human placenta. *Europ. J. of Cell Biol.* **69**, 99-106 (1996).
- Dobrota, M., R.H. Hinton: Large scale preparation of highly purified lysosomes from normal rat liver. *Anal. Biochem.* **102**, 97-102 (1980).

- Dormeyer, W., M. Ott, M. Schnolzer: Probing lysine acetylation in proteins: strategies, limitations, and pitfalls of in vitro acetyltransferase assays. *Mol. Cell Proteomics* **9**, 1226-1239 (2005).
- Ezaki, J., M. Himeno, K. Kato: Purification and characterization of (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase in rat liver lysosomal membranes. *J. Biochem. Tokyo* **112**, 33-39 (1992).
- Fan, X., H. Zhang, S. Zhang, R.D. Bagshaw, M.B. Tropak, J.W. Callahan, D.J. Mahuran: Identification of the Gene Encoding the Enzyme Deficient in MPS IIIC (Sanfilippo disease type C). *The American Journal of Human Genetics*, **79** (4), 738-44 (2006).
- Fedele AO., M. Filocamo, m. Di Rocca, G. Sersale, T. Lübke, P. di Natale, MP. Cosma, A. Ballabio. *Hum. Mutat.* **28** (5), 523 (2007).
- Forster, S., J.B. Lloyd: Solute translocation across the mammalian lysosomal membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* **947**, 465-491 (1988).
- Freeman, C., P.R. Clement, J.J. Hopwood: Acetyl-coenzyme A:  $\alpha$ -glucosaminide *N*-acetyltransferase: Partial purification from human liver. *Biochem. Intern.* **6**, 663-671 (1983).
- Fujita, H., J. Ezaki, Y. Noguchi, A. Kono, M. Himeno, K. Kato: Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 444-452 (1991).
- Fujita, H., Y. Takata, A. Kono, Y. Tanaka, T. Takahashi, M. Himeno, K. Kato: Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 604-611 (1992).
- Fukuda, M., J. Viitala, J. Matteson, S.R. Carlsson: Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* **263**, 18920-18928 (1988).
- Garbutt, G.J, E.C. Abraham: Non-enzymatic acetylation of human hemoglobins. *Biochem. Biophys. Acta.* **670**, 190-194 (1981).
- Gieselmann, V.: Lysosomal storage diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1270**, 103-136 (1995).
- Grässel, S., A. Röling, A. Hasilik: Immunoprecipitation of labeled antigens with Eupergit-C1Z. *Anal. Biochem.* **180**, 72-78 (1989).
- Hasilik, A., A. Waheed, K. von Figura: Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-*N*-acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 761-767 (1981).
- Hasilik, A.: The early and the late processing of lysosomal enzymes: Proteolysis and compartmentation. *Experientia* **48**, 130-151 (1992).
- Haust, M.D., B.A. Gordon: Ultrastructural and Biochemical Aspects of the Sanfilippo Syndrome,-Type III Genetic Mucopolysaccharidosis. *Conn. Tissue Res.* **15**,57-64 (1986).
- Hayes, B.K., A. Varki: Biosynthesis of Oligosaccharides in Intact Golgi Preparations from Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **268**, 16155-16169 (1993).
- Hiesberger, T., S. Hüttler, A. Rohlmann, W. Schneider, K. Sandhoff, J. Herz: Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *EMBO J.* **17**, 4617-4625 (1998).

- Hrebicek, M., Pshezhetsky, A.V., et.al.: Mutations in TMEM76 cause mucopolysaccharidosis type IIIC (Sanfilippo C syndrome). *The American Journal of Human Genetics*, 79 (4), 738-44 (2006).
- Jonas, A.J., H. Jobe: *N*-acetyl-D-glucosamine countertransport in lysosomal membrane vesicles. *Biochem. J.* **268**, 41-45 (1990).
- Jonas, A.J., R.J. Speller, P.B. Conrad, W.P. Dubinsky: Transport of *N*-acetyl-D-glucosamine and of *N*-acetyl-D-galactosamine by rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **264**, 4953-4956 (1989).
- Kamrath, F.J., G. Dodt, H. Debuch, G. Uhlenbruck: The isolation of lysosomes from normal rat liver by affinity chromatography, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **365**, 539-547 (1984).
- Kim, S., J. Ezaki, M. Himeno, K. Kato: Purification and characterization of flavine-adenine dinucleotide phosphohydrolase from rat liver lysosomal membranes. *J. Biochem. Tokyo*. **114**, 126-131 (1993).
- Klein, U., H. Kresse, K. von Figura: Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide *N*-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 5185-5189 (1978).
- Kornfeld, R., S. Kornfeld: Assembly of asparagine linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664 (1985).
- Kornfeld, S., I. Mellman: The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483-525 (1989).
- Kresse, H., K. von Figura, U. Klein, J. Glössl, E. Paschke, R. Pohlmann: Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Meth. Enzym.* **83**, 559-572 (1982).
- Kyouden, T., M. Himeno, T. Ishikawa, Y. Ohsumi, K. Kato: Purification and characterization of dipeptidyl peptidase IV in rat liver lysosomal membranes. *J. Biochem. Tokyo* **111**, 770-777 (1992).
- Lardeaux, B., B. Gouhot, M. Forestier: Improved recovery of rat liver fractions enriched in lysosomes by specific alteration of the sedimentation properties of mitochondria. *Anal. Biochem.* **131**, 160-165 (1983).
- Leighton, F., B. Poole, H. Beaufay, P. Baudhuin, J.W. Coffey, S. Fowler, C. de Duve: The large scale separation of peroxisomes, mitochondria and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339. *J. Cell Biol.* **37**, 482-513 (1968).
- Lemansky, P., Hasilik A.: Chondroitin sulfate is involved in lysosomal transport of lysozyme in U937 cells. *J. Cell Sci.* **114** (Pt 2), 345-52 (2001).
- Leslie, A.G., P.C. Moody, W.V. Shaw. Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4133-4137 (1988).
- Mane, S.M., L. Marzella, D.F. Bainton, V.K.Holt, Y.Cha, J.E. Hildreth, J.T. August : Purification and Characterization of Human Lysosomal Membrane Glycoproteins. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **268**, 360-378 (1989).
- McKusick, V.A., E.F. Neufeld: in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Herausgegeben von J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein und M.S. Brown) 5. Auflage McGraw Hill, New York, 751-777 (1983).
- Mehrabian, M., K.J. Bame, L.H. Rome: Interaction of rat liver lysosomal membranes with actin. *J. Cell Biol.* **99**, 680-685 (1984).



- Meikle, P.J., A.M. Whittle, J.J. Hopwood: Human acetyl-coenzyme A:  $\alpha$ -glucosaminide *N*-acetyltransferase. *Biochem. J.* **308**, 327-333 (1995).
- Metzelaar, M.J., P.L. Wijngaard, P.J. Peters, J.J. Sixma, H.K. Niewenhuis, H.C. Clevers: CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eucaryotic Cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 3239-3245 (1991).
- Mithieux, G., B. Rousset: Identification of a lysosome membrane protein which could mediate ATP-dependent stable association of lysosomes to microtubules. *J. Biol. Chem.* **264**, 4664-4668 (1989).
- Neuwald, A.F.: Barth Syndrome may be due to an acetyltransferase deficiency. *Curr.Biol.* **7**, (1998)
- Novikoff, A.B., H. Beaufay, C. de Duve. Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, suppl. 179-184 (1956).
- Ogata, S., M. Fukuda: Lysosomal targeting of LIMP II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **269**, 5210-5217 (1994).
- Peters, C., K. von Figura: Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett.* **346**, 108-114 (1994).
- Pisoni, R.L., V.Q.Vellila: Evidence for an essential histidine residue located in the binding site of the cysteine-specific lysosomal transport protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1236**, 23-30 (1995).
- Pisoni, R.L., J.G. Thoene: Detection and characterisation of a nucleotide transport system in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* **264**, 4850-4856 (1989).
- Pisoni, R.L., J.G. Thoene, R.M. Lemons, H.N. Christensen: Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system  $y^+$  of the human fibroblast. *J. Biol. Chem.* **262**, 15011-15018 (1987). (A)
- Pisoni, R.L., K.S. Flickinger, J.G. Thoene, H.N. Christensen: Characterization of carrier-mediated transport systems for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* **262**, 6010-6017 (1987). (B)
- Pisoni, R.L.: Characterization of a phosphate transport system in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* **266**, 979-85 (1991).
- Pohlmann, R., C. Krentler, B. Schmidt, W. Schröder, G. Lorkowski, J. Cully, G. Mersmann, C. Geier, A. Waheed, S. Gottschalk, K.H. Grzeschik, A. Hasilik, K. von Figura: Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J.* **7**, 2343-2350 (1988).
- Pohlmann, R., U. Klein, H.G. Fromme, K. von Figura: Localisation of Acetyl-coenzyme A:  $\alpha$ -glucosaminide *N*-acetyltransferase in Microsomes and Lysosomes of Rat Liver. *Hoppe-Seyler Physiol. Chem.* **362**, 1199-1207 (1981).
- Radons, J., C. Isidoro, A. Hasilk: Brefeldin A prevents uncovering but not phosphorylation of the recognition marker in cathepsin D. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **371**, 567-573 (1990).
- Rome, L.H., A.J. Garvin, M.M. Allietta, E.F. Neufeld: Two species of lysosomal organelles in cultured human fibroblasts. *Cell* **17**, 143-153 (1979).
- Rome, L.H., D.F.Hill, K.J. Bame, L.R. Crain: Utilization of Exogenously Added Acetyl Coenzyme A by Intact Isolated Lysosomes. *J. Biol. Chem.* **258**, 3006-3011 (1983).



- Sandoval, I.G., J.W. Chen, L. Yuan, J.T. August. Lysosomal Integral Membrane Glycoproteins Are Expressed at High Levels in the Inclusion Bodies of I-Cell Disease Fibroblasts. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **271**, 157-167 (1989).
- Schmidt, B., T. Selmer, A. Ingendoh, K. von Figura: A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* **82**, 271-278 (1995).
- Seyrantepe, V., F. Tihy, A.V. Pshezhetsky: The microcell-mediated transfer of human chromosome 8 restores the deficient *N*-Acetyltransferase activity in skin fibroblasts of Mucopolysaccharidosis type IIIC patients. *The American Journal of Human Genetics*, "in press" (2006).
- Sollner, T., S.W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, J.E. Rothman: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324 (1993).
- Stoorvogel, W., G.J. Strous, H.J. Geuze, V. Oorschot, A.L. Schwartz: Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* **65**, 417-427 (1991).
- Taute, A., K. Wätzig, B. Simons, C. Lohaus, H.E. Meyer, A. Hasilik: Presence of detergent-resistant microdomains in lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 5-9 (2002).
- Toma, L., C.P. Dietrich, H.B. Nader: Differences in the Nonreducing Ends of Heparan Sulfates Excreted by Patients with Mucopolysaccharidoses Revealed by Bacterial Heparitinases: A New Tool for Structural Studies and Differential Diagnosis of Sanfilippo's and Hunter's Syndrome. *Laboratory Investigation* **75**, 771-781 (1996).
- Trouet, A.: Immunisation de lapins par des lysosomes hépatiques des rats traités au Triton WR-1339. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **72**, 698-700 (1964).
- van Hille, B., M. Vanek, H. Richener, J. R. Green, G. Bilbe: Cloning and tissue distribution of subunits C, D and E of the human vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 15-21 (1993).
- van Hille, B., H. Richener, J.R. Green, G. Bilbe: The ubiquitous VA68 isoform of subunit A of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase is highly expressed in human osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 1108-1113 (1995).
- Varki, A., S. Diaz: The Transport and Utilization of Acetyl Coenzyme A by Rat Liver Golgi Vesicles. *J. Biol. Chem.* **260**, 6600-6608 (1985).
- Vega, M.A., B. Segui-Real, J.A. Garcia, C. Cales, F. Rodriguez Vanderkerckhove, I.V. Sandoval: Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* **266**, 16818-16824 (1991).
- Voznyi, Ya.V., E.A. Karpova, T.V. Dudukina, I.V. Tsvetkova, A.M. Boer, H.C. Janse, O.P. van Diggelen: A Fluorimetric Enzyme Assay for the Diagnosis of Sanfilippo Disease (MPS III C). *J. Inher. Metab. Dis.* **16**, 465-472 (1993).
- von Figura, K., A. Hasilik: Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 167-193 (1986).
- von Figura, K.: Human  $\alpha$ -*N*-acetyl-glucosaminidase. *Eur. J. Biochem.* **80**, 525-533 (1977).
- von Figura, K., B. Schmidt, T. Selmer, T. Dierks: A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases.: its role in catalysis and disease. *Bioassays* **20** (6), 505-10 (1998).

- Waheed, A., R. Pohlman, A. Hasilik, K. von Figura, A. van Elsen, J.G. Leroy:  
Deficiency of UDP-*N*-acetylglucosamine:lysosomal enzyme *N*-acetylglucosamine-1-phospho- transferase in organs of I-cell patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1052-1058 (1982).
- Waheed, A., S. Gottschalk, A. Hille, C. Krentler, R. Pohlmann, T. Bräulke, H. Hauser, H. Geuze, K. von Figura: Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells. *EMBO J.* **7**, 2351-2358 (1988).
- Wattiaux, R., S. Wattiaux-de Coninck, M.F. Ronveaux-Dupal, F. Dubois: Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J. Cell Biol.* **78**, 349-368 (1978).
- Wickner, W.T., H.F. Lodish. Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* **230**, 400-407 (1985).
- Wolff, D.A., H. Pertoft: The purification of lysosomes from HeLa cells by centrifugation in colloidal silica density gradients. *Biochim. Biophys. Acta* **286**, 197-204 (1972).

## *Lebenslauf*

Name: Beatrice Bodammer  
Wohnort: Scharnhorststr.31, 90491 Nürnberg  
Geburtsort: Braunschweig  
Geburtsdatum: 9.9.1962  
Familienstand: unverheiratet, 1 Tochter

### Schulische Laufbahn

1968-1969 Grundschole in Göttingen  
1970-1971 Broomall-School in Philadelphia, USA  
1971-1982 Rudolf-Steiner-Schule in Nürnberg  
Abschluß Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium

1986-1993 Diplom-Studium der Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg  
Abschluß Diplom-Prüfung, Schwerpunkte Biochemie, Botanik, Mikrobiologie und Informatik  
1994-1998 Experimenteller Teil der naturwissenschaftlichen Promotion

### Berufspraxis

1982-1994 Assistentin in der internistischen Praxis Dr. Bodammer  
1991-1992 Betreuung der EDV-Anlagen des Instituts für Biochemie der Universität Erlangen  
1994-1995 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der westfälischen Wilhelms-Universität in Münster, Fachbereich Humanmedizin in der medizinischen Forschung am Institut für Physiologische Chemie bei Prof. Dr. A. Hasilik  
1995-1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Philipps-Universität in Marburg, Fachbereich Humanmedizin in der medizinischen Forschung am Institut für Physiologische Chemie bei Prof. Dr. A. Hasilik  
seit 1998 Assistentin der Geschäftsleitung der Firma Funke-Gölitz, Uhren- und Schmuckgroßhandel und Immobilien